

# Untersuchung zum Auftreten genetischer Varianten im CYP2D6-Gen bei Patienten mit postoperativer(m) Übelkeit und/ oder Erbrechen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Konstanze Mühlmann-Gerlach, geb. Mühlmann

geb. am 24.04.1983, Leipzig

angefertigt an:

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Leipzig

Direktor: Prof. Dr. med. habil. U. Kaisers

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. H. Rüffert

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.06.2012

*Meiner Familie*

## Bibliographische Beschreibung

Mühlmann-Gerlach, Konstanze

Titel der Arbeit: „Untersuchung zum Auftreten genetischer Varianten im CYP2D6 Gen bei Patienten mit postoperativer(m) Übelkeit und /oder Erbrechen“

Universität Leipzig, Dissertation

110 Seiten gesamt, 71 Seiten Textteil, 92 Lit., 16 Abb., 25 Tab., 11 Seiten Anhang

## Referat

Postoperative Übelkeit und/oder Erbrechen (PONV: postoperative nausea and/or vomiting) stellen mit einer Inzidenz von etwa 30-80% eine häufige und für den Patienten unangenehme Nebenwirkung von Narkosen dar, die zu schweren postoperativen Komplikationen führen können und nicht unerhebliche Kosten für das Gesundheitssystem verursachen. Zur medikamentösen PONV-Prophylaxe werden u.a. die vom sog. CYP2D6-Enzym metabolisierten 5HT<sub>3A</sub>-Antagonisten verwendet. Das CYP2D6 ist ein hochpolymorphes Enzym aus der Cytochrom-P450 Familie. Mittlerweile sind ca. 80 Allele bekannt, die unterschiedliche Enzymaktivitäten repräsentieren. Man unterscheidet eine hohe Enzymaktivität beim *Extensive Metabolizer* (EM) vom *Poor Metabolizer* (PM) mit fehlender Enzymaktivität. Der *Intermediate Metabolizer* (IM) besitzt eine niedrige Enzymaktivität und der *Ultrarapid Metabolizer* (UM) hat eine sehr hohe Enzymaktivität. Ziel der vorliegenden Arbeit war die CYP2D6-Genotypisierung von PONV-Patienten, die abhängig von ihrer PONV-Risikostratifizierung eine Emesisprophylaxe erhielten oder nicht. Zur Genotypisierung wurde bei 97 Patienten das komplette CYP2D6-Gen sequenziert. Bei der Suche nach genetischen Varianten wurden auch nicht-kodierende Intronbereiche eingeschlossen. Zusätzlich wurden PCR-Assays zur Prüfung auf eventuelle CYP2D6-Duplikationen und –Deletionen angewandt. Nachfolgend wurden die ermittelten Genotypen durch ein Punktwertsystem einem Phänotyp zugeordnet. Bezüglich der Fragestellung der Wirksamkeit einer applizierten PONV-Prophylaxe in Abhängigkeit der vom Genotyp abgeleiteten individuellen Metabolisierungskapazität erfolgten statistische Gruppenanalysen nach Auftreten oder Nicht-Auftreten von PONV. Hierbei sollten ergänzende Informationen zur praktischen Anwendung im anästhesiologischen Sektor und mögliche Prädiktoren für PONV herausgearbeitet werden.

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG .....	C
REFERAT .....	C
I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	F
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	H
III TABELLENVERZEICHNIS.....	J
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. PONV.....	1
1.1.1. Definition .....	1
1.1.2. Pathophysiologie des Erbrechens .....	1
1.1.3. Bedeutung von PONV.....	2
1.1.4. PONV-Risikofaktoren .....	2
1.1.5. PONV-Prophylaxe .....	4
1.2. PHARMAKOGENETIK .....	5
1.3. DAS CYTOCHROM P450 SYSTEM .....	6
1.3.1. Das Cyp 2D6.....	6
1.3.4. Genort und Regulierung des CYP2D6.....	8
1.3.5. CYP2D6 Allele und ihre Metabolisierungskapazität .....	10
1.4. PHÄNOTYPISIERUNG DES CYP2D6 .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
2.1. STUDIENDESIGN.....	13
2.2. EDV.....	13
2.3. GERÄTE.....	14
2.4. METHODIK .....	14
2.4.1. DNA – Extraktion aus Vollblut .....	15
2.4.2. Die Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.4.3. Genotypisierung von CYP2D6 .....	17
2.4.4. PCR-Duplikation.....	23
2.4.5. PCR-Deletion.....	25
2.5. PRÄDIKTION DES RESPONSEVERHALTENS ÜBER DEN GENOTYP .....	27
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
3.1. PATIENTENCHARAKTERISIERUNG .....	29
3.2. ERGEBNISSE GENOTYPISIERUNG CYP2D6.....	30
3.2.1 Nachgewiesene genetische Varianten im CYP2D6 Gen .....	30
3.2.2 Häufigkeitsverteilung der detektierten CYP2D6-Allele .....	32
3.2.3 Genotypen und Metabolisierungskapazität .....	33
3.3. AUSMAß VON PONV NACH APPLIZIERTER ANTIEMETHISCHER THERAPIE MIT ONDANSETRON UND DEXAMETHASON .....	36
3.3.1. Analyse der Gruppe ohne PONV-Prophylaxe (Gruppe 0) .....	37
3.3.2. Gruppe mit PONV-Prophylaxe (Gruppe 1) .....	41
3.3.3. Auftreten von PONV unabhängig einer applizierten Emesisprophylaxe im gesamten Patientengut.....	46

# Inhaltsverzeichnis

---

3.4. ANALYSE MÖGLICHER PRÄDIKTOREN FÜR PONV .....	50
4. DISKUSSION .....	52
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	69
LITERATURVERZEICHNIS .....	I
ANHANG .....	XI
PRIMERHERSTELLUNG .....	XI
HERSTELLUNG DNTP'S.....	XI
HERSTELLUNG DES LADDERS .....	XI
HERSTELLUNG VON 10XBROMPHENOLBLAU .....	XI
HERSTELLUNG VON 0,5 M EDTA .....	XI
HERSTELLUNG VON 10X-TE-PUFFER .....	XI
HERSTELLUNG VON 10X-TBE-PUFFER (TRIS-BORAT-PUFFER) .....	XII
HERSTELLUNG DES AGAROSEGELS (1%).....	XII
PRIMER P100/200 UND SEQUENZIERPRIMER .....	XII
VERWENDETE PRIMER .....	XVII
AUSGEWÄHLTE SEQUENZKURVENAUSSCHNITTE DER NACHGEWIESENEN SNP'S .....	XVIII
POLYMORPHISMUS (STELLENANGABEN NACH KIMURA ET AL., 1989, M33388).....	XVIII
BEMERKUNGEN.....	XVIII
ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT .....	XXV
DANKSAGUNG.....	XXVI
LEBENS LAUF .....	XXVII

# Abkürzungsverzeichnis

---

## *I Abkürzungsverzeichnis*

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Reinstwasser)
ASA	American Society of Anesthesiologists
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre (kodierende) DNA
CGE	Kapillargelelektrophorese
CTZ	Chemosensorische Triggerzone
CYP2D6	Cytochrom P450 – Enzym der Genfamilie 2, Subfamilie D, Isoform 6
del	Deletion
DNA	2` - Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2´ - Desoxynukleosid - 5´ - triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EM	<i>Extensive Metabolizer</i>
for	forward (vorwärts, 5´->3´, sense)
g	Gramm
gER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
h	Stunde
HNF4 $\alpha$	Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$
IM	<i>Intermediate Metabolizer</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

kb	kilobase
kV	Kilovolt
l	Liter
L-Dopa	Levodopa
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
Mio.	Millionen
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	<i>Poor Metabolizer</i>
PONV	Postoperative Nausea and Vomiting (Postoperative Übelkeit und Erbrechen)
rev	reverse (rückwärts, 3' -> 5', antisense)
RNA	Ribonukleinsäure
sec.	Sekunde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelbasenaustausch)
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
UM	<i>Ultrarapid Metabolizer</i>
UV	Ultraviolett

## *II Abbildungsverzeichnis*

		Seite
Abb. 1	Röntgenkristallstruktur des CYP2D6-Gens (Rowland et al., 2005)	7
Abb. 2	Fotodokumentation „PCR-Gen“ (Primer P100/P200)	20
Abb. 3	Sequenzkurven: Teilsequenz aus CYP2D6 Intron 1 eines WT	21
Abb. 4	PCR zum CYP2D6 - Duplikationsnachweis schematisch	24
Abb. 5	PCR zum CYP2D6 - Deletionsnachweis schematisch	25
Abb. 6	Fotodokumentation „PCR-Deletion“ des CYP2D6	26
Abb. 7	Häufigkeitsverteilung der detektierten Polymorphismen in der Gesamtpopulation in Prozent	32
Abb. 8	Verteilung der detektierten Metabolisierungstypen innerhalb der gesamten Untersuchungsgruppe (n=97)	35
Abb. 9	Häufigkeit des jeweiligen Metabolisierungstypes bei den 50 Patienten, welche keine PONV-Prophylaxe erhielten	37
Abb. 10	Metabolisierungstypen von 18 Patienten, welche kein PONV-Ereignis ohne medikamentöse PONV Prophylaxegabe hatten	38
Abb. 11	Metabolisierungstypen von 32 Patienten, welche ein aktuelles PONV-Ereignis ohne medikamentöse PONV Prophylaxegabe hatten	39
Abb. 12	Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der gesamten Gruppe 1 (n=47), welcher eine kombinierte PONV Prophylaxe appliziert wurde	41
Abb. 13	Darstellung der vorkommenden Metabolisierungstypen bei 30 von 47 Patienten, welche eine Emesisprophylaxegabe erhielten und kein PONV entwickelten	43
Abb. 14	Darstellung der vorkommenden Metabolisierungstypen bei 17 von 47 Patienten, welche eine Emesisprophylaxegabe erhielten und ein PONV Ereignis entwickelten	44



## Abbildungsverzeichnis

---

- Abb. 15      Darstellung der Metabolisierungstypen der 48 Patienten ohne PONV- 46  
                 Auftreten. Bei dieser Betrachtung wurde eine eventuelle Gabe von  
                 Emesisprophylaxe vernachlässigt
- Abb. 16      Häufigkeitsverteilung der bestimmten Metabolisierungstypen innerhalb 47  
                 der 49 Patienten, welche unabhängig einer PONV-Prophylaxegabe  
                 postoperativ erbrochen haben

# Tabellenverzeichnis

---

## III Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab.1.1	Risikofaktoren für das PONV-Auftreten nach einer balancierten Allgemeinanästhesie und prognostizierte PONV-Inzidenz in % nach Summe der Risikofaktoren (nach Apfel et al., 1999)	3
Tab. 1.2	Überblick der Substrate, Inhibitoren und Induktoren des CYP2D6	8
Tab. 1.3	Übersicht des Punktwertsystems zur Einteilung des CYP2D6-Phänotypes über die detektierten Allele (Gaedigk et al., 2008)	12
Tab. 2.1	Verwendete Geräte	14
Tab. 2.2	Materialien für die DNA-Isolation	16
Tab. 2.3	PCR-Reaktionsansatz und Cyclotherprogramm der CYP2D6-Amplifizierung [nach Sachse et al., 1997]	19
Tab. 2.4	PCR-Reaktionsansatz und Cyclotherprogramm der Sequenzierungsreaktion	21
Tab. 2.5	PCR-Reaktionsansatz und Cyclotherprogramm der PCR „Duplikation“	24
Tab. 2.6	PCR-Reaktionsansatz und Cyclotherprogramm der PCR „Duplikation-Bestätigung“	25
Tab. 2.7	Reaktionsbedingungen der PCR „Deletion“	26
Tab. 3.1	Angabe der Medianwerte von Alter, BMI, ASA-Status und PONV-Risikoscores der 97 eingeschlossenen Patienten	29
Tab. 3.2	Häufigkeiten von PONV Risikofaktoren nach Apfel [2004] sowie einer durchgeführten antiemetischen Prophylaxe in der untersuchten Studiengruppe (n=97)	29
Tab. 3.3	Angabe der nachgewiesenen Polymorphismen, Bezeichnung nach der Allelnomenklatur M33388 der NCBI-Datenbank	31
Tab. 3.4	Detektierte Allelkonstellation und resultierender Metabolisierungstyp der gesamten Untersuchungsgruppe	33
Tab. 3.5	Detektierte Allelkonstellation und resultierender Metabolisierungstyp der gesamten Untersuchungsgruppe	34

## Tabellenverzeichnis

---

Tab. 3.6	Metabolisierungstypen und deren Geschlechterverteilung in Bezug zur Gesamtpopulation	35
Tab. 3.7	Häufigkeit der gefundenen Metabolisierungstypen mit Angabe der Geschlechterverteilung und Gesamthäufigkeit innerhalb Gruppe 0	37
Tab. 3.8	Auftreten von PONV und Metabolisierungstypen bei n=50 Patienten ohne Erhalt einer Prophylaxemedikation	39
Tab. 3.9	Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale innerhalb Gruppe 0 zwischen Patienten mit Auftreten von PONV (n=32) und Patienten ohne Auftreten von PONV (n=18)	40
Tab. 3.10	Häufigkeit der gefundenen Metabolisierungstypen mit Angabe der Geschlechterverteilung und Gesamthäufigkeit innerhalb Gruppe 1 (n=47 Pat. nach Emesisprophylaxe)	41
Tab. 3.11	Auftreten der Metabolisierungstypen bei den Ereignissen PONV-Auftreten und –Nichtauftreten innerhalb der Gruppe 1 (n=47) bei Männern und Frauen, sowie Aufführung der Gesamthäufigkeit und Signifikanz	42
Tab. 3.12	Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale innerhalb Gruppe 1 zwischen Patienten ohne Auftreten von PONV (n=33) und Patienten mit Auftreten von PONV (n=14)	45
Tab. 3.13	Verteilung der Metabolisierungstypen bei den Ereignissen PONV-Auftreten und Nichtauftreten innerhalb der gesamten Untersuchungspopulation (n=97) bei Männern und Frauen, sowie Aufführung der Gesamthäufigkeit	48
Tab. 3.14	Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale zwischen Patienten ohne Auftreten von PONV (n=48) und Patienten mit Auftreten von PONV (n=49) unabhängig einer Emesisprophylaxegabe	49
Tab. 3.15	Ergebnisse der binär logistischen Regression und zugehörige Konfidenzintervalle	50

# 1. Einleitung

---

## 1. Einleitung

### 1.1. PONV

#### 1.1.1. Definition

PONV (engl.: **p**ost-**o**perative **n**ausea and/or **v**omiting) bezeichnet Übelkeit und/oder Erbrechen bis 72 Stunden postoperativ [Golembiewski et al., 2005], wobei man PONV bis 24 Stunden postoperativ als *early* PONV und nach 48 bis 72h Stunden als *late* PONV bezeichnet [White et al., 2008].

#### 1.1.2. Pathophysiologie des Erbrechens

Erbrechen stellt den phylogenetischen Bestandteil eines Schutzreflexes zur Eliminierung inkorporierter Gifte dar [Andrews et al., 1992].

Das Brechzentrum liegt in der Medulla oblongata im Bereich der Formatio reticularis und wird u.a. über die Chemorezeptoren der Area postrema am Boden des IV. Ventrikels gesteuert. Diese außerhalb der Blut-Hirn-Schranke befindliche Kontrollzentrale wird als chemosensorische Triggerzone (CTZ) bezeichnet, welche über eine Vielzahl von metabolischen und hormonellen Reizen erregt werden kann [Eberhart et al., 2000]. Zur Aktivierung führen beispielsweise Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin, Muscarin, aber auch Medikamente wie L-Dopa, Opioide und Herzglykoside [Bunce et al., 1992; Bardenheuer et al., 1997; Watcha et al., 2000].

Unabhängig von der CTZ wirken Entzündungen der Bauchorgane, Ileus, Kinetosen, Hypotension, erhöhter intrakranieller Druck und Hypoxie über afferente Nerven emetogen [Andrews et al., 1992; Takeda et al., 1993; Koller et al., 1994; Maddali et al., 2003; Golembiewski et al., 2005].

Im Gegensatz zum opioid- bzw. chemotherapie-induzierten Erbrechen ist die Pathophysiologie von PONV kaum geklärt, es existieren zu wenig etablierte Tiermodelle. Es ist bekannt, dass Primaten und Raubtiere auf dieselben emetischen Reize wie Menschen reagieren. Postoperatives Erbrechen kommt jedoch ausschließlich beim Menschen vor [Andrews et al., 1992; Watcha et al., 2000].

# 1. Einleitung

---

## 1.1.3. Bedeutung von PONV

PONV ist ein sehr belastendes Ereignis für den Patienten. Mit einer Inzidenz von 20-80% ist PONV die häufigste Komplikation einer Narkose [Cohen et al., 1986; Apfel et al., 1999]. Das Vermeiden von PONV ist den Betroffenen genauso wichtig wie das Vermeiden von Schmerzen [Macario et al., 1999]. Sie würden bis zu 100 Dollar in Privatleistung übernehmen, um PONV zu vermeiden [Gan et al., 2002]. Hinzu kommen Aspirationsgefahr, Gefährdung des Eingriffserfolges, psychische Belastung, Verzögerung der Mobilisation, vermehrter pflegerischer Aufwand, ungeplante Hospitalisation und letztlich höhere Kosten [Macario et al., 1999]. Das Thema PONV ist somit ökonomisch interessant, denn eine Prophylaxe beim PONV-Risikopatienten ist kosteneffektiv [Watcha et al., 2000].

Vergleicht man die Anästhesiekosten für Medikamente und Verbrauchsmaterial sind die Kosten einer PONV-Prophylaxe und Therapie gering [Frighetto et al., 1999].

Am ökonomischsten wäre es, jene Patienten zu behandeln, die mindestens zwei Risikofaktoren aufweisen [Apfel et al., 2002].

## 1.1.4. PONV-Risikofaktoren

PONV ist ein multifaktorielles Geschehen, für welches zahlreiche Arbeiten und Metaanalysen Risikofaktoren benannten [Apfel et al., 2005]. Tabelle 1.1 liefert einen Überblick der bisher veröffentlichten PONV-Risikofaktoren.

In Bezug auf das Geschlecht haben nach älteren und neueren Studien Frauen definitiv ein ca. zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko, an PONV zu erkranken [Bellville et al., 1961; Apfel et al., 1999]. Im Hinblick auf das Alter steigt die Inzidenz von PONV bis zur jungen Adoleszenz. Beträgt sie bei Säuglingen 5%, steigt sie bei Kindern und Jugendlichen auf Erwachsenenniveau an, um bei zunehmendem Alter wieder abzusinken. Davon unabhängig finden sich bei älteren Personen vermehrt physiologische Veränderungen, die Einfluss auf den Arzneimittelstoffwechsel haben. So nimmt im Alter die Leber- und Nierenfunktion ab. Ebenfalls kann die Blut-Hirnschranke leichter überwunden werden. Außerdem leiden ältere Menschen häufig unter einer Unterernährung oder selektiver diätetischer Ernährung, was ebenso Einfluss auf den Abbau von Medikamenten hat [Vandell et al., 2003]. Auch aufgrund dieser Erkenntnisse liegen Alters- oder geschlechtsbezogene Therapieempfehlungen für stark von CYP2D6 abhängig metabolisierten Arzneistoffen nahe.

# 1. Einleitung

Cohen et al. führten eine Studie mit etwa 16.000 Patienten durch, wonach Raucher signifikant weniger an PONV erkrankten [Cohen et al., 1994]. Autoren wie Apfel und andere bestätigten dies [Koivuranta et al., 1997; Apfel et al., 1998]. Die Ursache für diesen Nikotin-protectiven Effekt scheint dennoch nicht eindeutig geklärt. Man vermutet eine nikotinbedingte Downregulation der Dopaminrezeptoren am synaptischen Spalt [Serhen et al., 1995]. Laut einer Studie von Sweeney et al. beeinflussen die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe des Zigarettenrauches die Cytochromoxidasen der Leber [Sweeney et al., 2002]. Das könnte zu einem veränderten Abbau von Medikamenten führen und die PONV-Rate senken.

PONV-Risikofaktoren (nach Apfel et al., 1999):	weibliches Geschlecht
	Nichtraucherstatus
	PONV in Anamnese oder Reisekrankheit
	postoperative Opioidgabe
Geschätzte PONV-Inzidenz (in %) beim Vorliegen von in Summe:	
0 Faktoren:	10%
1 Faktor:	21%
2 Faktoren:	39%
3 Faktoren:	61%
4 Faktoren:	79%

Tab. 1.1: Risikofaktoren für das PONV-Auftreten nach einer balancierten Allgemeinanästhesie und prognostizierte PONV-Inzidenz in % nach Summe der Risikofaktoren [nach Apfel et al., 1999]

Ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) wird nicht als gesicherter Risikofaktor für PONV betrachtet. Eine Studie von Kranke et al. widerlegte einen Zusammenhang [Kranke et al., 2001].

Allgemeinanästhesien gehen im Vergleich zur Regionalanästhesie mit einem doppelt so hohen PONV-Risiko einher. Medikamente wie Etomidate, Ketamin und Thiopental wurden mehrfach als emetogen beschrieben, da sie das vestibuläre System besonders reizen sollen [Clark et al.,

# 1. Einleitung

---

1984; Camu et al., 1992]. Die totale intravenöse Anästhesie (kurz:TIVA) zeigt sich deutlich weniger emetogen [Tramer et al., 1997].

Die Applikation von Opiaten führt zu einer Verdopplung der PONV-Rate [Apfel et al., 1999]. Die Ursache hierfür scheint in einer Kombination aus intestinaler Motilitätshemmung, vestibulärer Reizung und Serotoninfreisetzung zu liegen [Apfel et al., 2000].

## 1.1.5. PONV-Prophylaxe

Es wurden über die bekannten Risikofaktoren Prognosesysteme entwickelt, um nach Anamnese der Risikofaktoren das individuelle PONV-Risiko vorherzusagen und folglich eine PONV-Prophylaxe planbar zu machen [Palazzo et al., 1993; Toner et al., 1996; Koivuranta et al., 1997; Apfel et al., 1999]. In dieser Arbeit wurde das Prognosesystem nach Apfel [Apfel et al., 1999] verwendet. Hierbei werden für die Faktoren weibliches Geschlecht, PONV oder Reisekrankheit in der Anamnese, Nichtraucherstatus und postoperative Opioidgabe je der Punktwert 1 vergeben. Das prozentuale PONV-Risiko wird aus der Punktsumme der Risikofaktoren ermittelt. Eine tabellarische Übersicht der bekannten PONV-Risikofaktoren und geschätzter PONV-Inzidenzen [nach Apfel et al., 1999] kann der Tab. 1.1 (S.3) entnommen werden.

Generell sollten gesicherte emetogene Faktoren beim PONV-Risikopatienten vermieden werden. Des Weiteren ist wegen besserer Verträglichkeit eine Regionalanästhesie der Narkose vorzuziehen [Sinclair et al., 1999]. Bei der Durchführung der Allgemeinanästhesie sollte zur Aufrechterhaltung statt eines stärker emetogen wirkenden volatilen Anästhetikums eher auf die intravenöse Gabe von Propofol ausgewichen und die Gabe von Lachgas vermieden werden [Apfel et al., 2004]. Bezüglich der peri- sowie postoperativen Schmerztherapie sollte eher auf Nichtopioidgabe bzw. vorrangig auf regionalanästhetische Verfahren gesetzt werden [Barker et al., 1996].

Zur medikamentösen PONV-Prophylaxe können heute verschiedene Substanzklassen eingesetzt werden. Am gebräuchlichsten sind Dopaminantagonisten (Metoclopramid, Droperidol und Haloperidol), das Kortikosteroid Dexamethason, Histaminantagonisten (Dimenhydrinat) und Serotoninrezeptorantagonisten (Ondansetron, Granisetron, Palonosetron). Seltener wird das Anticholinergikum Scopolamin verwendet. Desweiteren steht zur Prämedikation der Neurokininantagonist Aprepitant zur oralen Verfügung [Rüsch et al., 2010].

# 1. Einleitung

---

Die Teilnehmer dieser Arbeit erhielten im Fall einer indizierten PONV-Prophylaxe eine Kombination aus Dexamethason und Ondansetron. Dexamethason ist ein Corticosteroid und induziert das CYP2D6-Enzym. Seit den 80er Jahren ist deren potente antiemetische Wirksamkeit bekannt, deren Ursache bis heute nicht geklärt ist. Ondansetron ist ein Serotoninantagonist (5HT<sub>3A</sub>-Antagonist, Setron) mit hoher antiemetischer Effektivität bei günstigem Nebenwirkungsprofil.

## 1.2. Pharmakogenetik

Etwa 35-50 Mio. Europäer erhalten ungeeignete Medikamentendosierungen, weil dem Verordner keine Informationen über die genetische Basis der betreffenden Metabolisierungsenzymaktivität vorlagen[Ingelmann-Sundberg et al., 2004].

Innerhalb der kaukasischen Bevölkerung unterliegen 7% dem Vorhandensein defizienter Allele. Somit sind sie z.B. nicht in der Lage, CYP2D6-Substrate effizient zu metabolisieren [Sachse et al. 1997] und sind dem Risiko diesbezüglicher unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen ausgesetzt [Eichelbaum et al., 1982].

Im Jahre 1959 beschrieb der Heidelberger Humangenetiker Vogel den Begriff der Pharmakogenetik [Vogel et al., 1959]. Dieses Gebiet der Wissenschaft befasst sich mit dem Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Pharmakokinetik und -dynamik von Arzneimitteln. Viele verabreichte Medikamente bedingen bei einheitlicher Standarddosierung unterschiedliche Reaktionen im Organismus, vom kompletten Wirkungsverlust eines Stoffes bis hin zu seiner Akkumulation mit teils lebensbedrohlichen Folgen.

Inzwischen sind für viele der am Arzneistoffwechsel teilhabenden Enzyme und Transportproteine die codierenden Gene identifiziert worden. Polymorphismen (Genvarianten mit einer Häufigkeit von mehr als 1%) oder seltene Genmutationen (Genvarianten mit einer Häufigkeit von unter 1%) sind bekannt. Diese Genaberrationen können zu fehlender oder herabgesetzter Synthese der betreffenden Proteine führen, wodurch der Verlust oxidativer Proteine oder auch eine geänderte Affinität bei Transportproteinen resultieren.

Heute sind viele genetische Polymorphismen bekannt, die bei der Arzneimittelverstoffwechselung Beachtung finden müssen. Eine standardisierte Testung aller Patienten auf einen Genotyp ist jedoch derzeit nicht sinnvoll und praktikabel, da bislang keine konkreten therapeutisch verwertbaren Schlussfolgerungen und Therapieempfehlungen vorliegen [Kirchheiner et al. 2006].



# 1. Einleitung

---

## 1.3. Das Cytochrom P450 System

Cytochrome sind Hämoproteine, die als Redoxkatalysatoren der biologischen Oxidation dienen. Sie kommen ubiquitär in den Zellen aller Sauerstoff verbrauchenden Organismen vor, hauptsächlich an der Membran des gER's. Beim Menschen befinden sie sich zu 90-95% im Lebergewebe [Schwab et al., 2002].

Das Cytochrom P 450-System ist ein Sammelbegriff für die Gruppe der mischfunktionellen Monooxygenasen, welche ca. 80% der gebräuchlichen Medikamente und weitere Substrate metabolisieren. Der Name leitet sich vom Absorptionsmaximum im reduzierten Zustand nach Bindung von Kohlenmonoxid ab, der bei 450nm liegt.

Ihre Funktion besteht in der Hydroxylierung von Substraten in der Phase 1 der Biotransformation. Umgesetzt werden vor allem apolare Verbindungen, die aliphatische oder aromatische Strukturen enthalten (z.B. Steroidhormone). So werden lipophile Verbindungen hydrophil und damit ausscheidbar gemacht.

Derzeit sind 107 humane Cytochrom P450-Gene identifiziert worden. Diese kodieren 57 aktive Cytochrom P 450-Enzyme (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>).

Die Einteilung der Gene erfolgte in mehr als 18 Genfamilien unter Zuteilung einer arabischen Ziffer: z.B. CYP2. Die Aminosäuresequenz in einer solchen Familie ist zu mindestens 40% identisch. Des Weiteren werden Subfamilien unterschieden, in welchen die Aminosäuresequenz zu mindestens 55% identisch ist. Die Kennzeichnung erfolgt mit einem Großbuchstaben: z.B. CYP2D. Beim Menschen sind inzwischen etwa 43 Subfamilien bekannt [Nebert et al., 2002]. Innerhalb der Subfamilien werden aufgrund der Sequenzhomologie Isoformen unterschieden. Das jeweilige Gen erhält ebenfalls eine arabische Ziffer: z.Bsp. CYP2D6 [Nelson et al., 1996].

Die 58 bekannten Pseudogene können durch vorzeitigen Abbruch des Leserahmens keine aktiven Enzyme exprimieren und erhalten zur Kennzeichnung den Buchstaben "P" hinter dem CYP-Namen (z.Bsp. das Pseudogen CYP2D7P).

### 1.3.1. Das Cyp 2D6

Das in dieser Arbeit untersuchte hochpolymorphe Gen CYP2D6 kodiert das entsprechende gleichnamige Enzym. Es ist das bisher bestuntersuchte Enzym seiner Art [Schwab et al., 2002]. Seine Röntgenkristallstruktur ist auf Abb. 1 zu sehen.

# 1. Einleitung

---

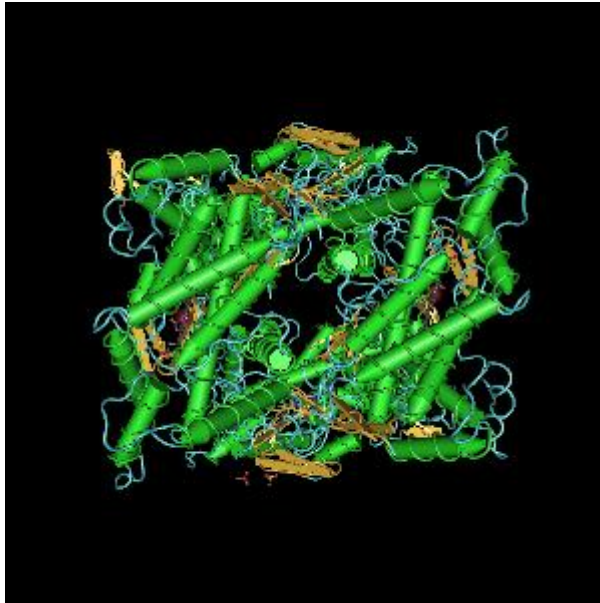


Abb.1: Röntgenkristallstruktur des CYP2D6-Gens (Rowland et al., 2005 - aus NCBI:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdbsrv.cgi?uid=36878>)

In den 70er Jahren haben das Antihypertensivum Debrisoquin und das Antiarrhythmikum Spartein zur Entdeckung des CYP2D6 geführt [Mahgoub et al., 1977; Eichelbaum et al., 1975, 1979]. Im Jahre 1985 konnte das CYP2D6-Protein aus Lebermikrosomen isoliert werden [Distlerath et al., 1984]. Kurz nach der Isolierung der cDNA [Gonzalez et al., 1988] gelang schließlich seine Sequenzierung. Der Genlocus liegt auf dem Chromosom 22q3.1 [Kimura et al., 1989].

Der Anteil von CYP2D6 aller CYP450-Enzyme in der Leber beträgt etwa 3% [Zanger et al., 2004]. Dennoch katalysiert CYP2D6 etwa ein Viertel der Metabolisierungen klinisch gebräuchlicher Arzneimittel [Ingelman-Sundberg et al., 2005].

Einen Überblick der wichtigsten Substrate des CYP2D6, sowie dessen Inhibitoren und Induktoren soll Tabelle 1.2 geben.

# 1. Einleitung

CYP2D6				
Betablocker	Antiarrhythmika	Antidepressiva	Neuroleptika	Sonstige
Carvedilol Metoprolol Timolol Propafenon	Flecainid Mexiletin Propafenon	Venlafaxin Amitryptilin Clomipramin Desipramin Imipramin Fluoxetin Paroxetin	Haloperidol Risperidon Chlorpromazin Thioridazin	Ondansetron Tamoxifen Tramadol Dextromethorphan Lidocain Amphetamin Codein
<b>Inhibitoren:</b>	Amiodaron	Chinidin	Cimetidin	Clomipramin
	Fluoxetin	Haloperidol	Methadon	Paroxetin
	Ritonavir	Sertralin		
<b>Induktoren:</b>				Rifampicin Dexamethason

Tabelle 1.2: Überblick der Substrate, Inhibitoren und Induktoren des CYP2D6

Die Enzymaktivität weist große intra- und interindividuelle Variabilitäten auf.

Ausgehend von ihrer individuellen Metabolisierungsaktivität werden folgende Phänotypen im CYP-System unterschieden: *Extensive Metabolizer* (EM) mit höherer Enzymaktivität, *Intermediate Metabolizer* (IM) mit reduzierter Enzymaktivität und der *Poor Metabolizer* (PM) ohne Enzymaktivität. Enzyme mit stark potenzierte Aktivität, bei beispielsweise vorliegender Duplikation eines oder mehrerer Genabschnitte sind sogenannte *Ultrarapid Metabolizer* (UM).

Das Phänotypisierungsverfahren konnte in den letzten zwanzig Jahren mit Entwicklung der Allel-spezifischen PCR-Tests stark vereinfacht werden. Somit wurden immer mehr der inzwischen über 80 Allelvarianten identifiziert [Heim und Meyer et al.,1990; Meyer und Zanger et al.,1997; Ingelmann-Sundberg et al., 1999; Daly et al., 2003].

## 1.3.4. Genort und Regulierung des CYP2D6

Das Wildtyp-Gen (OMIM 124030) CYP2D6 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 22 an Position 13.1. Die Gesamtlänge des Gens beträgt 4383 bp (Accession NG 008376). Der AS kodierende Bereich besteht aus 9 Exons und umfasst insgesamt 1637 bp (mRNA, Accession NM\_000106). An seinem 5'-Ende liegen zwei hochhomologe Pseudogene (CYP2D7 und

# 1. Einleitung

---

CYP2D8), deren Nukleotidfolge zu 92-97% mit CYP2D6 identisch ist [Kimura et al. 1989]. Der Eintrag in die Gendatenbank lautet: LOCUS HUMCYP2D6 9432bp DNA PRI 22-Nov-1994, DEFINITION Human Cytochrome P450 IID6 (CYP2D6) gene, complete cds, Accession M33388 [Kimura et al., 1989].

Das CYP nimmt eine Schlüsselfunktion in der Biotransformation von Fremdstoffen ein, die einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzymsystems haben. Im Rahmen der Induktion führt eine Vielzahl von Wirkstoffen über eine Aktivierung der Genexpression zu einer vermehrten Bildung von Enzymmolekülen und damit zu einer Aktivitätssteigerung des Enzymsystems. Bislang ist allerdings sehr wenig über die CYP2D6-Genregulation und die Konsequenzen von Sequenzvarianten in der upstream gene region bekannt [Raimundo et al., 2000; Gaedigk et al., 2003; Zanger et al., 2001].

Eukaryontische Gene besitzen kodierende und nichtkodierende Abschnitte (Exons und Introns). Die speziesabhängige Gruppierung der CYP-Gene an spezifischen Orten bestimmter Chromosomen ermöglicht eine koordinierte Regulation [Pearce et al., 1992]. Meist entscheidet die Struktur des Induktors, worauf im Ablauf der Genexpression ein Einfluss ausgeübt wird [Waxman et al., 1992]. Auch wenn die Regulationsvorgänge bisher nicht endgültig aufgeklärt sind, wird vermutet, dass die Induktoren (s.a. Tab. 1.2) mit spezifischen Regulationselementen direkt interagieren [Omura et al., 1993; Hines et al., 1994] und somit über eigene Regulationselemente eine Induktion des CYP hervorrufen können. Diese Interaktion löst einen Kettenmechanismus aus. Zuerst bindet der Induktor an ein lösliches, intrazelluläres Rezeptorprotein, dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, der auch als Ah-, TCDD- oder Dioxin-Rezeptor bezeichnet wird [Whitlock et al., 1986; Gotoh et al., 1989]. Dieser Rezeptor besitzt viele gemeinsame Eigenschaften mit den Glucocorticoidrezeptoren [Denis et al., 1988; Perdew et al., 1988]. Im nächsten Schritt dissoziiert der Ah-Rezeptorkomplex unter Abspaltung des Hitze-Schock-Proteins (HSP 90). Somit wird die Bindung des sogenannten Ah-Rezeptor-Nukleus-Translokationsfaktors möglich, der die Verlagerung des Rezeptorkomplexes in den Kern erleichtert. Dieser Komplex interagiert mit Regulationselementen, die sich in den Regulationsregionen des CYP2D6-Gens befinden. Ein wesentlicher Transkriptionsfaktor des CYP2D6 ist ebenfalls HNF4 $\alpha$  (Hepatic Nuclear Factor 4 $\alpha$ ). In einer Arbeit von Corchero et al. wird aufgezeigt, dass HNF4 $\alpha$  auch in vivo das CYP2D6 reguliert [Corchero et al., 2001].

Der molekulare Mechanismus der Enzyminduktion besteht in einer verstärkten Genexpression. Nach 2-3 Wochen wird die max. Enzyminduktion beobachtet. Nach dem Absetzen eines

# 1. Einleitung

---

Medikamentes kann die verstärkte Enzyminduktion noch für 3-4 Wochen anhalten [Vögtli et al., 2010].

## 1.3.5. CYP2D6 Allele und ihre Metabolisierungskapazität

Im Folgenden soll eine Darlegung der wesentlichen CYP2D6-Phänotypen und deren bestimmende, für diese Arbeit relevante Allele erfolgen (einsehbar unter: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>).

### 1.3.5.1. Poor Metabolizer (PM)

Etwa 5-10 % der kaukasischen Bevölkerung exprimieren aufgrund diverser Mutationen das CYP2D6-Gen nicht [Sachse et al., 1997]. Daraus resultiert eine fehlende Enzymaktivität. Null-Allele des CYP2D6 innerhalb der Population dieser Arbeit sind \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*13, \*15, \*21 und \*33. Die Wichtigsten sind \*3, \*4, \*5 und \*6, da mit ihnen nahezu 100% der PM's in der kaukasischen Bevölkerung erfassbar sind [Zanger et al., 2004; Gaedigk et al., 1999]. Aufgrund der fehlenden Enzymaktivität ist die Metabolisierung der betreffenden Arzneimittel nicht oder nur teilweise über andere Enzyme möglich. Somit akkumulieren bei fortgesetzter Medikamenteneinnahme die Wirkstoffe im Organismus. Die Folge können schwerwiegende Nebenwirkungen, z.B. lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen, sein.

### 1.3.5.2. Intermediate Metabolizer (IM)

Die Gruppe der IM's ist durch das Vorhandensein eines funktionsfähigen Allels mit einem Nullallel oder eines vermindert funktionsfähigen Allels mit einem Nullallel gekennzeichnet. Die erhaltene Teilfunktion bedingt eine reduzierte Funktionalität des Enzyms [Raimundo et al., 2000; Schwab et al., 2002; Zanger et al., 2004], woraufhin die Inzidenz sog. unerwünschter Arzneimittelwirkungen aufgrund von Wirkstoffakkumulationen steigt. In dieser Arbeit vorkommende IM-Allele sind: \*9, \*10, \*17 und \*29.

### 1.3.5.3. Extensive Metabolizer (EM)

Die Gruppe der EM's verfügen über eine schnelle Enzymaktivität, die sich aus dem Vorhandensein zweier voll funktionsfähiger Allele sowie eines aktiven Allels in Verbindung mit einem Allel reduzierter Aktivität ergibt. Das Wildtypallel wird mit \*1 beziffert und besitzt keinerlei Polymorphismen im Gen. Weitere für die vorliegende Arbeit relevante EM-Allele sind: das Allel \*2, \*22, \*28, \*34, \*35 und \*39. Eine Besonderheit besteht im Allel \*35. Etwa 20% der UM-Träger im Phänotyp besitzen das Allel \*35 und sind phänotypisch EM's. In der kaukasischen Bevölkerung beträgt das Vorkommen 0,036 (nach Hap Map-CEU). Lovlie et al. identifizierten den Basenaustausch G>A an der Stelle 31 (M33388, Kimura et al., 1989) im

# 1. Einleitung

---

ersten Exon, wonach es zum Aminosäureaustausch Val 11 Met kommt [Lovlie et al., 2001]. Das Allel \*35 kam in duplikationsnegativen UM's signifikant häufiger vor. In einer Arbeit von Allorge et al. konnte statt erhöhter Metabolisierungsaktivität eine normal schnelle Aktivität beim Allel-\*35-Träger nachgewiesen werden [Allorge et al., 2001].

## 1.3.5.4. Ultrarapid Metabilizer (UM)

Etwa 5,5 % der Kaukasier zählen zu den UM's. Ursächlich für eine beschleunigte Arbeitsweise des Enzyms sind Duplikationen und Multiduplikationen auf einem Allel [Dalén et al., 1998]. Die jeweiligen Allele sind bisher mit bis zu 2, 3, 4, 5 und 13 Kopien des CYP2D6 Gens bekannt [Ingelmann-Sundberg et al., 1999; Aklillu et al., 1996]. Konsequenz ist die zu schnelle Metabolisierung der verabreichten Substanz, woraus eine verminderte Wirkung resultiert. Eine individuelle Dosissteigerung wäre notwendig.

## 1.4. Phänotypisierung des CYP2D6

Die Bestimmung des Phänotypes wird benötigt, um eine Aussage über die Enzymfunktion treffen zu können. Hierfür existieren zwei grundlegende Verfahren. Zum Einen die in-vivo-Bestimmung der sog. *Metabolic Ratio*, einem Quotienten aus der Menge einer verabreichten Testsubstanz und der Menge des nach der Metabolisierung entstandenen Metaboliten als Maß für die Katalysierungsaktivität. Für die CYP2D6-Phänotypisierung wird meist Dextromethorphan verwendet. Dem Probanden wird eine Testdosis von 30 mg oral verabreicht. Anschließend muss der Patient 5 h Urin sammeln. Aus dieser Probe wird die Konzentration des Metaboliten Dextrorphan gemessen. Die MR wird berechnet, im Anschluss wird mittels Tabellen anhand des berechneten Wertes der entsprechende Phänotyp (EM, IM, PM oder UM) abgelesen. Nachteilig an der Methode ist ihre Fehleranfälligkeit. Die MR-Berechnung kann aufgrund von Datenstreuungen ungenau sein. Die Metabolitkonzentrationsbestimmung im Urin kann aufgrund von Verschiebungen des pH-Wertes verfälscht sein, da dieser Einfluss auf die Clearance eines Arzneimittles ausübt. Letztlich ist auch die Compliance des Patienten wichtig, da zum Beispiel die Aufnahme bestimmter Getränke und Nahrungsmittel den Urin-pH-Wert verschiebt. Die Verlässlichkeit des fünfstündigen Urinsammelns seitens des Patienten gilt zusätzlich als kritisch. Mittlerweile kann auch eine Dextrorphan-Konzentrationsbestimmung im Blut oder im Speichel erfolgen.

Aufgrund des steigenden Informationsgehaltes der Beschaffenheit der Genotypen gewinnt heute vermehrt die ex-vivo Phänotypisierung an Bedeutung. Hierbei wird der Phänotyp aus

# 1. Einleitung

dem ermittelten Genotypen abgeleitet. Aufgrund der Datenlage der früheren und heutigen bestimmten MR's der jeweiligen Allele werden zunehmend die aufwendigen in-vivo Verfahren verlassen. Ein Verfahren zur ex-vivo Phänotypisierung des CYP2D6 wurde in Form eines Enzym-Aktivität-Punkte Systems von Gaedigk et al. etabliert [Gaedigk et al., 2008]. Es umfasst 21 Allele und die Vervielfachung von 5 Allelen, welche häufig vorkommen. Die CYP2D6 Allele werden kodominant vererbt. Jedes einzelne Allel trägt mit seiner Aktivität zur Gesamtaktivität des Enzyms bei. Der Score reicht von 0 für keine Aktivität bis 2 im Falle einer vermehrten Aktivität bei Genvervielfältigung. Bildet man die Summen der Aktivitäten beider Allele erhält man Werte zwischen 0 und 3. Daraufhin erfolgt die Einstufung der CYP2D6-Feinaktivität .

Eine Darstellung des AS-Systems liefert Tabelle 1.3.

Activity Score	Allele
0	*3, *4, *4xn, *5, *6, *7, *16, *36, *40, *42, *56B
0,5	*9, *10, *17, *29, *41, *45, *46
1	*1, *2, *35, *43, *45xn
2	*1xn, *2xn, *35xn

Tab. 1.3: CYP2D6 Allele mit dem zugehörigen AS (Activity Score) nach Gaedigk et al.[2008]

Da nicht alle in dieser Arbeit nachgewiesenen Allele in der Bewertung von Gaedigk et al. vorkommen, wurde eine Modifikation dieses Scores vorgenommen. Hierfür wurde die Erweiterung der bewerteten Allele mithilfe der veröffentlichten Datenlage hinsichtlich bekannter Metabolisierungskapazitäten der übrigen Allele, welche im Vorfeld durch in-vivo-Bestimmungen bestimmt wurden, vorgenommen (s.a. Kap. 1.4.). Letztlich wurde über die berechneten Punktwerte dem jeweiligen Patienten der Status des PM's, EM's, IM's oder UM's vergeben.

## **2. Material und Methoden**

---

### **2. Material und Methoden**

#### **2.1. Studiendesign**

Im Hinblick auf die durchzuführenden genetischen Untersuchungen wurde festgelegt, dass alle Teilnehmer kaukasischen Ursprungs sein mussten. Die Stichprobe umfasste 100 freiwillige und volljährige Probanden, die akut an PONV erkrankten oder PONV in der Anamnese hatten.

Eingeschlossen wurden Probanden, die zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gerade einen operativen Eingriff mit nachfolgendem Eintritt von postoperativer Übelkeit, Erbrechen oder beiden Symptomen hatten oder in der Anamnese PONV beschrieben. Zur Erfassung der gängigen PONV Risikofaktoren wurde ein Fragebogen verfasst. Darüber hinaus wurden die Art der Operation, Geschlecht, Body Mass Index, Art der Anästhesie und Beatmung und weitere Begleiterkrankungen erfasst. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, die regelmäßige Einnahme von Neuroleptika und Benzodiazepinen sowie Erkrankungen, die Übelkeit, Erbrechen und Motilitätsstörungen hervorrufen können (z.B. Magen-Darm-Infekte, schwere Herzinsuffizienz, schwere Leber- und Nierendysfunktion und Ulcera im Gastrointestinaltrakt). Letztlich konnten 97 Teilnehmer eingeschlossen werden. Hiervon erbrachen 49 ohne Betrachtung einer eingesetzten medikamentösen PONV-Prophylaxe mindestens einmal innerhalb eines sechsständigen postoperativen Beobachtungszeitraumes. 48 Patienten wiesen hingegen ausschließlich eine positive PONV-Anamnese (mindestens ein Ereignis mit postoperativem Erbrechen bei stattgehabten Allgemeinanästhesien in der Vergangenheit) auf.

Die Studie wurde von der Ethikkommission an der Universität Leipzig unter ethischen, medizinischen, wissenschaftlichen und juristischen Gesichtspunkten geprüft und genehmigt (Reg.-Nr. 273/2004). Die Teilnehmer der Studie waren in der Lage, die Studienbedingungen zu verstehen und gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis für die notwendigen genetischen Untersuchungen.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden alle Daten bei Erhebung mit Codenummern anonymisiert.

#### **2.2. EDV**

Die direkte Datenerfassung, Textverarbeitung und Tabellenkalkulation erfolgte mit einem PC unter Windows XP und Vista, Word 2007 und Office 2007. Zur Datenanalyse wurde das SPSS – Statistikpaket (Version 12.0) verwendet.



## 2. Material und Methoden

Um Informationen über das Gen CYP2D6 zu gewinnen und die Methodik zu planen, wurden im Internet die nachfolgend aufgeführten Datenbanken verwendet:

- Literaturrecherche: Medline, NLM Pubmed, Medscape, Ovid
- The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Allelnomenklatur: [www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)

Die Übersetzung der Sequenzerdaten erfolgte auf einem PC mittels der ABI 310 Data Collection Software v2.0.

### 2.3. Geräte

In vorliegender Arbeit wurden die in Tab.2.1 aufgeführten Geräte verwendet.

Verfahren	Gerät und Hersteller
PCR	Cycler GeneAmp.® PCR System 2700 von Applied Biosystems
Sequenzierung	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser von Applied Biosystems
DNA-Isolierung	Eppendorf Bio Photometer
	Eppendorf Thermomixer Comfort
	Biofuge pico von Heraeus
	Labofuge 400R
Elektrophorese	Elektrophoresekammer von Roth
	Elektrophorese-Netzteil Consort
	UV-Transilluminator der Firma VILBER LOURMAT mit einer Wellenlänge von 312nm

Tabelle 2.1: Übersicht verwendeter Geräte dieser Arbeit

### 2.4. Methodik

Zunächst wurde die DNA aus Vollblut extrahiert. Das Vorgehen der Genotypisierung des CYP2D6 in dieser Arbeit wird ab Kap. 2.4.3. erläutert.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.4.1. DNA – Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des „Invisorb Blood Giga Kit 100“ (Invitex, Berlin-Buch) aus kernhaltigen Blutzellen nach dem Prinzip der Proteinaussalzung [Miller et al., 1988]. Hierzu waren je Proband 10ml EDTA-Blut erforderlich mit einer zu erwartenden DNA-Ausbeute von 370-460µg. Die DNA-Proben wurden in TE-Puffer (10 mM Tris-Puffer/1 mM EDTA, pH 8) eluiert und bei 4°C bis zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in sterilen Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Das EDTA-Blut wurde mit vier Volumenteilen kaltem Puffer 1 (pH7,4) auf 50ml aufgefüllt. Nach der Hämolyse erfolgte die dreiminütige Zentrifugation bei 3000U/min. Der entstandene Überstand aus hämolysierten Erythrozyten wurde dekantiert und verworfen, das Tube mit dem entstandenen hellroten Pellet nochmals mit 20ml Puffer 1 auf dem Rüttler resuspendiert. Anschließend wurde nochmals für 3 Minuten bei 3000U/min. zentrifugiert und der Überstand anschließend erneut dekantiert und verworfen. Das Sediment wurde in 3ml Puffer 2 aufgenommen.

Je Probe wurden 50 µl Proteinase K (20mg/ml) dazugegeben. Nach der vollständigen Resuspendierung auf dem Rüttler erfolgte die Inkubation im 60°C warmen Wasserbad für 60min. unter gelegentlichem Mischen.

Im Anschluss wurde der Röhrcheninhalt in ein neues Tube überführt. Nun wurde der Probe 1,8ml Puffer 3 hinzugegeben. Nach kurzem Aufschütteln erfolgte zur Ausfällung der Proteine (mit NaCl) die Inkubation im Eisbad für 5 Minuten. Danach wurde für 25 Minuten bei 3500U/min zentrifugiert. Dann wurde zur Lipidentfernung und Phasentrennung mit VT Isopropanol aufgefüllt und bis zum Auftauchen der DNA-Flocke geschwenkt. Die DNA-Flocke wurde in ein neues Tube (1,5ml) überführt und zur Waschung mit 1ml 70 prozentigem Ethanol aufgefüllt. Dann wurde die Probe bei 8000U/min für 6 Minuten zentrifugiert und der Ethanol-Überstand zur Verwerfung abgenommen. Die DNA-Flocke wurde mit dem Schüttler an der Luft getrocknet. Je nach entstandener Größe der DNA-Flocke wurde mit 100-1000 µl des hinzugegebenen 1x TE-Puffers für 48 Stunden bei 50°C aufgelöst. Anschließend erfolgte die Überführung in die Archivröhrchen und Lagerung bei 4°C.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Nach Abgleich mit 1xTE wurde 5 µl DNA mit Wasser im Verhältniss 1:100 verdünnt und die Absorption spektrophotometrisch bei  $\lambda=260\text{nm}$  (Absorptionsspektrum für Nukleinsäuren)

## 2. Material und Methoden

und  $\lambda_{280}$  nm (Absorptionsspektrum für Proteine) bestimmt. Eine optische Dichte (1 OD) von 260 nm entsprechen 50  $\mu$ g dsDNA. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  als Reinheitsmaß sollte optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration der DNA wurde automatisch vom Photometer mittels folgender Formel berechnet:  $C \text{ (}\mu\text{g/ml)} = E \times K \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times f/1000$  [ $c$  = Konzentration,  $E$  = Extinktionsfaktor,  $K$  = Konstante (50  $\mu$ g/ml),  $f$  = Verdünnungsfaktor (100)].

- Für die Isolierung der DNA wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Chemikalien verwendet.

DNA-Isolierung	invisorb Blood Giga Kit	Invitek
	Isopropanol	J.T. Baker
TE-Buffer	EDTA (Titriplex)	Merck
	TRIS	SERVA

Tabelle 2.2: Für die DNA-Isolierung verwendete Materialien

### 2.4.2. Die Polymerase-Kettenreaktion

Im Jahre 1983 entwickelte der US-amerikanische Biochemiker Kary Banks Mullis [Mullis et al., 1986] eine Methode zur beliebigen Vervielfältigung (Amplifikation) von definierten DNA-Abschnitten, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dafür wurde er im Jahre 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Die PCR ist eine thermozyklische Methode zur Amplifizierung von DNA. Der PCR Ansatz beinhaltet Primer, eine Polymerase, Nukleotide, PCR-Puffer und Abschnitte der zu vermehrenden DNA. Das Verfahren der PCR zur gezielten Vermehrung definierter DNA-Abschnitte ist sowohl sehr sensitiv als auch hochspezifisch. Man erwartet am Ende der Reaktion  $10^6$ - $10^9$  Kopien des gewünschten DNA-Abschnittes.

Ein Zyklus besteht aus 3 Schritten. Zuerst wird die Doppelstrang DNA bei 94°C zu Einzelstrang DNA denaturiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Primer-Annealing. Hierbei werden Primer im 5' Bereich der DNA an komplementären Sequenzabschnitten angelagert, von welchen aus die Polymerase arbeitet. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Sequenz und Länge der Primer.

Im letzten Schritt, der Extension, ergänzt die Polymerase nun die einzelsträngige zur doppelsträngigen DNA. Hierfür knüpft sie Nukleotide komplementär an die freie OH-Gruppe

## 2. Material und Methoden

---

des Zuckers im Nukleotid. Das Temperaturoptimum richtet sich nach der verwendeten Polymerase und liegt zwischen 70 und 80°C. Zuletzt wird der PCR Ansatz auf 4°C heruntergekühlt, um unspezifische Reaktionen der Reagenzien zu vermeiden.

### 2.4.3. Genotypisierung von CYP2D6

Die Genotypisierung des CYP2D6 wurde in folgenden Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das gesamte Gen amplifiziert. Die PCR-Kontrolle erfolgte mittels Gelelektrophorese. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mittels Qiagenkit aufgereinigt und als Template für die folgenden mutationsscreenenden Sequenzierungsreaktionen bereitgestellt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Kompletsequenzierung des CYP2D6-Gens erfolgte im Rahmen einer Pilotstudie. Es wurden 16 Sequenzierprimer zur vollständigen Gensequenzierung des CYP2D6 designed, um die Nested-PCR zu sparen. Eine Übersicht der verwendeten Primer (s. Anhang S. XIX) und Reaktionsbedingungen sind nachfolgend aufgeführt. Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurden die Reagenzien aufeinander abgestimmt und die Annealing-Temperaturen ermittelt. Vor der Herstellung der Reaktionsansätze wurden die Reagenzien aufgetaut und mittels Vortexer aufgeschüttelt. Es erfolgte die anschließende Anfertigung des Master Mix, welcher die erforderlichen dNTPs, Primer, MgCl<sub>2</sub> und Puffer enthielt. Nachdem der Master Mix auf Eis gestellt war, wurde die Polymerase hinzugefügt. Im Anschluss wurde die erhaltene Menge erneut aufgeschüttelt und durch die Anzahl der zu amplifizierenden Proben geteilt. Nun konnte in die Tubes die ermittelte Menge des Mastermixes pipettiert werden.

Zusätzlich zur CYP2D6-Gen Kompletsequenzierung erfolgten Assays zur Detektion möglicher Duplikationen und der Deletion.

Im Anhang finden sich ergänzend Methodenbeschreibungen zur Herstellung verwendeter Chemikalien (s. Anhang S. XIII-XIV).

#### 2.4.3.1. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Um die Qualität und Quantität der PCR-Produkte zu kontrollieren, wurden die amplifizierten Gen-Fragmente einer Gelelektrophorese zugeführt. Zur Reinheitskontrolle wurde ein Leerwert als Negativprobe mitgeführt. Nach dem Auftragen von jeweils 8 µl der jeweiligen DNA-Proben mit je 2 µl eines BBS Ladungspuffers in die vorhergesehenen Geltaschen wurde eine Spannung von 80 Volt über 5 min. und dann für weitere 30-40 min. bei 120 V angelegt. Durch den parallel mitlaufenden DNA-Längenstandard, einem 10 kb DNA-Ladder (Hyper Ladder I), war die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente ablesbar. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde dem Agarose-Gel vor der Aushärtung in einer horizontalen Elektrophoresekammer

## 2. Material und Methoden

---

Ethidiumbromid zugegeben, welches sequenzunabhängig in der DNA interkaliert und nach Anregung durch UV-Licht (254-360 nm) im sichtbaren Bereich von 590 nm fluoresziert. Die erhaltenen Gelbanden wurden unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit konventioneller Fotografie (Kamera Fuji-Systems und Mitsubishi P91 Printer) dokumentiert.

In dieser Arbeit wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet. Die Herstellung des Gels wird im Anhang (s.S. XIV) beschrieben.

### **2.4.3.2. Reinigung der PCR-Produkte**

Um die mutationsscreenenden Sequenzierungsreaktionen durchführen zu können, mussten die entstandenen PCR-Nebenprodukte (Salze, Enzyme, Restprimer, überschüssige dNTP's) mittels Aufreinigung entfernt werden. Ebenso erfolgte in diesem Arbeitsschritt die Spaltung der Endonukleasen, um die direkte Sequenzierung vorzubereiten.

Die Reinigung erfolgte mittels *Qiaquick PCR Purification Kit*<sup>®</sup> (Fa. Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll.

Zunächst wurde pro Mikrozentrifugensäule 40 µl PCR-Produkt mit 200 µl Bindungspuffer (PB-Puffer) gemischt und für 1 min. bei 14000 U/min. zentrifugiert. Durch die hohe Salzkonzentration des Puffers bindet dabei die DNA an die Silikatmembran der Säule, während die überschüssigen Stoffe die Membran passieren. Darauf folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl PE-Puffer (1 min., 14000 U/min.) zur Entfernung restlicher Salze. Um etwaige Reste des Waschpuffers zu beseitigen, wurde nochmals für 1 min. zentrifugiert und für 1 min. getrocknet. Zuletzt wurden die PCR-Proben je nach ihrer Quantität mit etwa 20 µl HPLC-Wasser versetzt und im letzten Zentrifugationsschritt für 1 min. bei 14000 U/min. eluiert.

Nach der Reinigung musste die Ausbeute der PCR-Produkte elektrophoretisch kontrolliert werden. Hierfür wurden 4 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl 10 x BBS-Ladungspuffer gemischt und auf einem 1%-igen Agarose-Gel aufgebracht. Um zu bestimmen, wieviel DNA-Menge in der nachfolgenden Sequenzierungsreaktion einzusetzen wäre, genügte die visuell geschätzte Bandenintensität.

### **2.4.3.3. PCR-CYP2D6**

Um das CYP2D6-Gen sequenzieren zu können und Koamplifikationen mit den benachbarten hochhomologen Pseudogenen CYP2D7 und CYP2D8 zu vermeiden, wurde zunächst das

## 2. Material und Methoden

gesamte CYP2D6-Gen in Anlehnung an Sachse et al. [ 1997] amplifiziert. Hierbei erhält man 4681bp, die alle 9 Exons und 8 Introns beinhalten.

Folgende Primer [nach Sachse et al., 1997] wurden hierfür verwendet: P100 Forward 5` (Forwärtsprimer) und P200 Reverse 5` (Rückwärtsprimer). Primersequenzen s. Anhang (S. XIV-XVIII).

Der PCR-Ansatz und das Cyclerprogramm werden in Tab.2.3 dargestellt.

Reagenz	Menge	PCR-Programm		
Aqua dest.	24,5µl	Initiale Denaturierung:	95°C	5 min.
10xOptibuffer	5µl	35X:		
MgCl <sub>2</sub>	3µl	Denaturierung:	95°C	30 sec.
dNTP	5µl	Annealing:	63°C	30 sec.
Primer P100/P200	Je 1µl	Elonation:	68°C	5 min.
Bio-X-Act long (Polymerase)	0,5µl	End Extention:	68°C	10 min.
DNA	10µl	Ende:	4°C	

Tabelle 2.3: PCR-Reaktionsansatz und Cyclerprogramm der Amplifizierung des CYP2D6-Gens mit Primerpaar P100/P200 [nach Sachse et al., 1997]

In jedem Reaktionsansatz lief eine Wasser enthaltende Negativprobe mit. Die Kontrolle der Amplifikation erfolgte auf einem 1%-igen Agarosegel mit Zugabe von Ethidiumbromid (0,5µl/ml) als Farbstoff (s.a. Kap. 2.4.3.2.).

In Abb. 2 sind DNA-Amplifikate mit einer Größe von >4000 bp dargestellt. In diesem Fall wurde eine erfolgreiche Reaktion angenommen, zusätzlich war die Negativprobe mit Wasser unauffällig, sodass von sauberen Reaktionsbedingungen ausgegangen wurde. Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

## 2. Material und Methoden

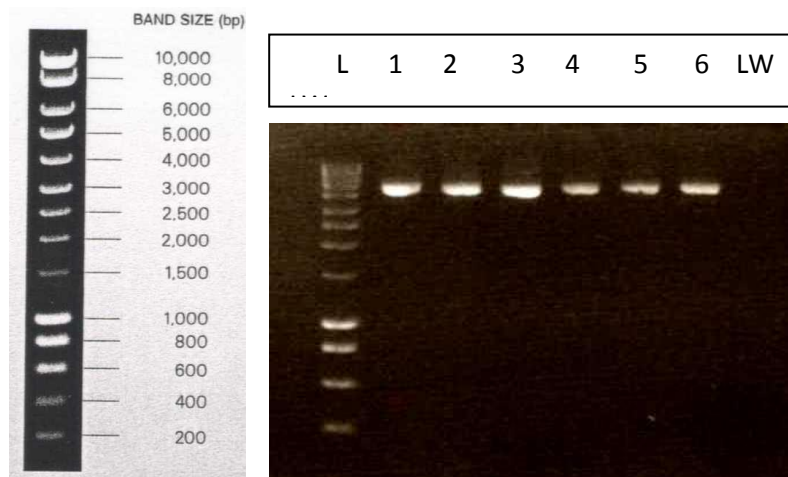


Abb. 2: links: Größenstandard der Banden vom Hersteller in bp, rechts daneben Fotodokumentation einer PCR, in welcher mit P100/P200 das gesamte CYP2D6-Gen (4681bp) amplifiziert wurde. L=Ladder, 1-6 = Patienten 1-6, 7 = Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O (LW=Leerwert)

### 2.4.3.4. Sequenzierungsreaktion-Pilotstudie zum CYP2D6-Mutationsscreening

Im Anschluss an die PCR, in welcher zunächst spezifisch das gesamte CYP2D6-Gen amplifiziert wurde, konnten die eigens entwickelten Sequenzierungsassays vorgenommen werden. Das Neuartige dieser Methode lag darin, dass nach der Amplifikation des CYP2D6-Gens (nach Sachse et al., 1997) nicht weitere PCR's vor der Sequenzierung erfolgen mussten. Beispielsweise konnte die Durchführung einer Nested-PCR zur gezielten Allel-Detektion gespart werden. Zusätzlich konnten die bisher wenig untersuchten 8 Introns des CYP2D6-Gens Base für Base untersucht werden. Die Sequenzierungsprimer wurden so designed, dass pro Reaktion ein Produkt mit etwa 500 bp amplifiziert wurde. Alle 9 Exons und 8 Introns wurden sequenziert. Somit wurden pro Patient mindestens 11 Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Mithilfe speziell entwickelter Rückwärtsprimer konnten auch schwer zu entziffernde Stellen, bspw. eine Frameshift, zweifelsfrei sequenziert werden. Im Fall des Detektierens einer neuen Mutation sollte zur Bestätigung die betreffende Stelle überdies rückwärts sequenziert werden. Die Kurvenauswertung erfolgte visuell. Im Falle der Rückwärtssequenzierung mussten die Basen komplementär abgelesen werden.

Die Basenabfolge der Sequenzierprimer ist im Anhang aufgeführt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen gestalteten sich PCR-Ansatz und Cyclerprogramm wie nachfolgend in Tab.2.4 dargestellt.

## 2. Material und Methoden

Reagenz	Menge		
Aqua dest.+Template	2,5µl	96°C	2 min.
Big Dye Polymerase	0,5µl	96°C	10 sec.
Reaktionspuffer	2µl		
Primer	1µl	50°C	5 sec.
PCR Produkt aus Vor-PCR (P100/P200)	4µl	60°C	4 min.
		4°C	X25 Zyklen

Tabelle 2.4: PCR-Reaktionsansatz und Cyclerprogramm der Sequenzierungsreaktion des CYP2D6-Gens

Im Anschluss erfolgte eine Natriumacetatfällung . Die getrockneten, ausgefällten Pellets wurden mit H<sub>2</sub>O aufgelöst und in speziellen Tubes für den ABI-Prism 310 Sequenzer gefüllt. Danach wurden die Proben sequenziert. Nach Auswertung der Daten mit der ABI-Prism data collection software konnte die Ablesung der Basen zur Polymorphismensuche beginnen. Auf Abb. 3 ist ein Ausschnitt des ausgewerteten Introns 1 eines Wildtyp-Gens dargestellt.

A G G G A G G A G G T C C T G G A G G G C G G C A  
 300 310

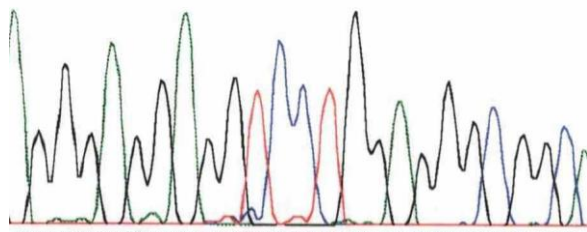


Abb. 3: Teilsequenz aus dem Intron 1 des WT-CYP2D6-Gens

Die nachfolgende Typisierung der Probanden anhand der Kurvenauswertungen mit Zuordnung der Allele wird im Anschluss gesondert erwähnt (s Kap.2.5.).



## 2. Material und Methoden

---

### **2.4.3.5. Ausfällen der Sequenzierungsprodukte**

Nach der Sequenzierreaktion musste die enthaltene DNA ausgefällt werden, um überschüssige dNTPs, Enzyme und Salze, sowie nicht eingebaute ddNTP's zu entsorgen.

Die Proben wurden mit 3 M Natriumacetat und 0,5 M EDTA (pH 8,0) versetzt. Nach Mischen und kurzem Zentrifugieren erfolgte die Zugabe von 50 µl Ethanol absolut, wonach erneut gemischt und zentrifugiert wurde. Im Anschluss erfolgte die 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach 20 min. Zentrifugation mit 13.000 U/min. wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen. Dann wurden 200 µl 70 %-iges Ethanol hinzugefügt und für 5 min. bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Überstandes erfolgte die Trocknung für 2 min. bei 95°C. Jedes Pellet wurde mit 22 µl Aqua bidest aufgelöst und bei -20°C gelagert.

### **2.4.3.6. Kapillargelelektrophorese und Detektion der Sequenzierungsreaktion im ABI Prism 310 Sequenzautomaten**

Bei der Kapillargelelektrophorese (CGE) wandern die negativ geladenen Nucleinsäuren in einer von Elektrophoresepuffer umgebenden Gelmatrix in einem elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei werden sie nach Größen sortiert. Der Innendurchmesser der Kapillare beträgt 50 µm. Durch die günstigen physikalischen Eigenschaften der Kapillare können die Läufe unter sehr hohen Spannungen aufgebaut werden. Die entstandene Wärme kann an den extrem dünnen Kapillaren schnell abgeführt werden. Durch die hohe Spannung (bis 15 kV) wird ein schneller Durchlauf ermöglicht.

Die DNA-Produkte aus der Sequenzierungsreaktion wurden in der Kapillarelektrophorese automatisch (*ABI Prism 310 Sequenzer*) aufgetrennt. Hierbei wurden den PCR Produkten spezifische Primer, DNA Polymerase, Deoxy-Nukleotide (dNTPs) und Fluoreszenz markierte dideoxy-Nukleotide (ddNTPs) beigefügt. Ähnlich einer PCR-Reaktion wurden durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen die an die PCR Produkte angelagerten hybridisierten Primer durch Aufnahme von deoxy-Nukleotiden elongiert. Schloss sich an ein deoxy-Nukleotid ein Fluoreszenz markiertes dideoxy-Nukleotid (ddNTP's) an, wurde die Polymerisation gestoppt. Diese ddNTP's wirkten als Terminatoren, weil DNA, die ein Dideoxynukleotid enthält, kein freies 3'OH zur Polymerisation besitzt. Nach dem Stopp hatte das jeweilige Fragment seine endgültige Größe erreicht, wodurch Fragmente aller Größen entstanden.

Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurden in einem Gel-Bild die erhaltenen Sequenzen analog mit den vorher im Sample Sheet festgelegten Bezeichnungen der Proben in

## 2. Material und Methoden

---

Kongruenz gebracht. Die Auswertung der Probenläufe wurde durch Fluoreszenzmarkierung ermöglicht, wobei die Farbstoffe über einen fokussierenden Argon-Laser angeregt wurden. Nach spektraler Aufspaltung an einem Beugungsgitter wurde die Auswertung der Emissionen über eine hochauflösende Kamera durchgeführt. Eine gerätespezifische Software, die *Sequence Analysis Software*, konvertierte die Fluoreszenzsignale in Form von kleinen sichtbaren Kurven (Peaks). Die detektierten Emissionspeaks wurden in eine Sequenzabfolge übersetzt. Letztlich erhielt man vierfarbige Kurven zur Auswertung.

Jede Farbe steht für eine Base. Rot bedeutet T (Thymin), schwarz G (Guanin), grün A (Adenin) und blau C (Cytosin). Für die Auswertung bei verwendeten Rückwärtsprimern mussten die Basen komplementär abgelesen werden.

### 2.4.4. PCR-Duplikation

Um eine CYP-2D6-Genduplikation zu detektieren, wurde in dieser Arbeit eine Methode nach Lovlie et al. [1996] verwendet, welche im Jahre 1998 durch Steijns et al. unter Hinzugabe von Magnesiumchlorid und Modifizierung der DNA-Polymerasekonzentration weiterentwickelt wurde.

Der Vorwärtsprimer CYP-17f und der Rückwärtsprimer CYP-32r amplifizierten im Falle einer Duplikation ein 3600 bp messendes Fragment der CYP2D6-CYP2D6-Dup-Region. Zusätzlich amplifizierte ein zweiter Vorwärtsprimer (CYP-207f) in der Kontrollreaktion ein 5200 bp messendes Fragment der zwischenliegenden Region von CYP2D7-CYP2D6. Somit war der zweite Ansatz mit den Primern CYP-207F/CYP-32r eine Kontrollreaktion, weil nur 2 Genkopien des CYP2D6-Gens erfasst wurden. In der Abbildung 4 werden die PCR-Schemata der CYP2D6-Duplikationsdetektion vereinfacht dargestellt.

## 2. Material und Methoden

PCR-Schema Duplikation nach Lovlie et al., 1996

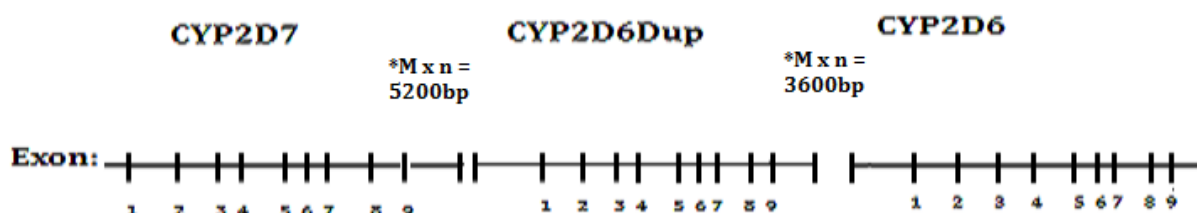


Abb. 4: PCR-Schema zum Nachweis der Duplikation am molekulargenetischen Aufbau des CYP2D6-Gens

Wurde also ein 3600 bp messendes Fragment in der PCR mit den Primern CYP-17f/CYP-32r (Dup-PCR-1) detektiert, erfolgte zur Bestätigung eine zweite PCR mit den Primern CYP-207f/CYP-32r (Dup-PCR-2). Im Falle eines 5200 bp-Fragments galt eine CYP2D6-Duplikation als bewiesen. Tabelle 2.5 zeigt den Reaktionsansatz und die Reagenzien der Dup-PCR-1, in Tabelle 2.6 werden diese der Reaktion Dup-PCR-2 dargestellt. Die Auswertung erfolgte anhand des Bandenmusters der Gelelektrophorese.

<b>PCR- Mastermix;</b>	<b>Wasser (bidest) 14,75 µl</b>
	<b>10x Opti Buffer 2,5 µl</b>
	<b>MgCl2 1,5 µl</b>
	<b>dNTPs (2mM) 2,5 µl</b>
	<b>Primer CYP 17f 0,5 µl</b>
	<b>Pimer CYP 32r 0,5 µl</b>
	<b>Polymerase BioX-Act-Long 0,25 µl</b>
<b>25µl Reaktionsansatz nach Hinzusetzen von:</b>	<b>DNA 2,5 µl</b>
<b>PCR-Programm: im Thermocycler:</b>	<b>5 min. bei 94°C</b>
	<b>35x ( 20 s 96°C – 30 s 58°C – 5 min 68°C)</b>
	<b>10 min 68°C</b>
	<b>Ende 4°C</b>

Tab. 2.5: Reaktionsbedingungen für die Dup-PCR-1 der Primer CYP-17f/CYP-32r

## 2. Material und Methoden

PCR-Mastermix:	Wasser (bidest) 14,75µl
	10x Opti Buffer 2,5 µl
	MgCl <sub>2</sub> 1,5 µl
	dNTPs (2mM) 2,5 µl
	Primer CYP 207f 0,5 µl
	Pimer CYP 32r 0,5 µl
	Polymerase BioX-Act-Long 0,25 µl
25µl Reaktionsansatz nach Hinzusetzen von:	DNA 2,5 µl
PCR-Programm: im Thermocycler:	5 min. bei 94°C
	35x ( 20 s 96°C – 30 s 58°C – 5 min 68°C)
	10 min 68°C
	Ende 4°C

Tab. 2.6: Reaktionsbedingungen für die Dup-PCR-2 der Primer CYP-207f/CYP-32r

### 2.4.5. PCR-Deletion

Die CYP2D6-Deletion wurde mit einer long-range-PCR nach Steen et al. [ 1995a] durchgeführt. Die Reaktion wird schematisch auf Abbildung 5 dargestellt. Bei Nachweis eines 3.5 kb messenden Fragmentes wurde eine Deletion angenommen. Zur Positivkontrolle wurde vormals CYP2D6-Deletion positiv getestete DNA eingesetzt.

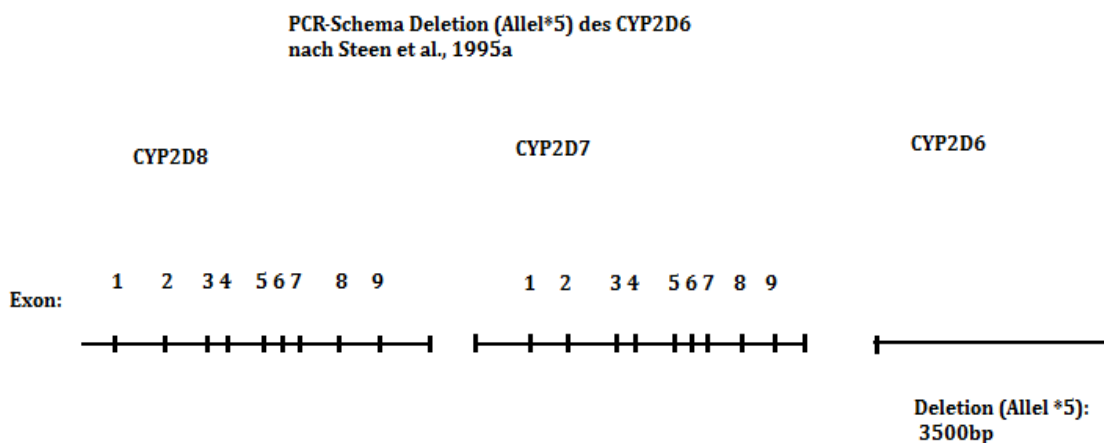


Abb. 5: PCR "Deletion"schematisch [nach Steen et al., 1995a]

Da nur im Falle einer vorliegenden Deletion ein Amplifikat nachweisbar war, wurde nach Sachse et al., 1997, ein interner Standard geführt, um falsch-negative Ergebnisse

## 2. Material und Methoden

auszuschließen. Zur Kontrolle der PCR wurde ein Kontrollfragment einer CYP2D6 unabhängigen Reaktion mit den Primern P4647F und PRYR1-48R detektiert. Außerdem lief eine Positivreaktion mit. Bei Probanden, die keine Deletion aufwiesen, wurde in einer zweiten PCR durch Zugabe des Primers P81, ein 4,2kb großes PCR-Produkt detektiert, um das Wildtyp-Allel nachzuweisen.

<b>PCR-Mastermix (25µl):</b>	<b>13,5µl Aqua dest.</b>
	<b>2,5µl Opti-Buffer</b>
	<b>1,5µl MgCl<sub>2</sub></b>
	<b>2,5µl Dntp</b>
	<b>Je 1µl Primer Del-F+Del-R u. 4647F+RYR1-48R</b>
	<b>0,5µl Polymerase (Bio-X-Act-long)</b>
	<b>2,5µl DNA</b>
<b>PCR-Programm im Thermocycler:</b>	<b>94°C – 2min.</b>
	<b>35x (94°C 15s – 65°C 30s – 68°C 5min)</b>
	<b>68°C 5min</b>

Tab. 2.7: Reaktionsbedingungen der PCR "Deletion"

Die optimale Primerkonzentration wurde experimentell bestimmt.

Die Auswertung erfolgte anhand der Bandenmuster in der Gelelektrophorese (s. Abb. 6).

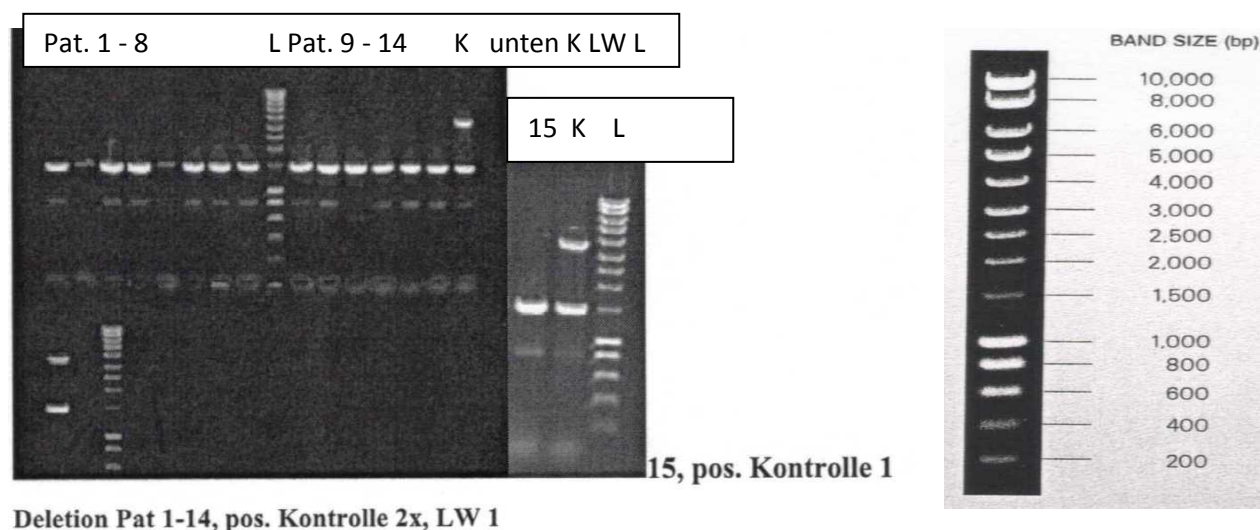


Abb. 6: Bandenmuster PCR "Deletion", hier Pat. 2 und 5 nicht sichtbar (nachfolgende Wiederholung), bei den Pat. 1+3-4+6-14 keine Deletion bei nachweisbarem 1500bp-Produkt, die mitgelaufene Positivkontrolle (K) wurde 2x aufgetragen und zeigt das 3500bp-Produkt bei vorliegender Deletion; die Negativkontrolle mit Wasser (LW) zeigt Probenreinheit an. DNA-Letter (L)

## 2. Material und Methoden

---

### 2.5. Prädiktion des Responseverhaltens über den Genotyp

Es existieren in der Literatur verschiedene Ansätze der Entwicklung von Punktsystemen, um die Aktivität des CYP2D6-Proteins über den Genotyp vorauszusagen. Gaedigk et al. verfassten ein Activity-Score-System [Gaedigk et al., 2008]. Steimer et al. validisierten eine Berechnung der sogenannten Semiquantitativen Gendosis, welche später von Kirchheiner et al. ergänzt wurde [Steimer et al., 2004; Kirchheiner et al., 2004].

Nach der kompletten Genotypisierung des CYP2D6-Gens in dieser Arbeit erfolgte die Zuordnung der Allele. Hierzu wurden die detektierten Polymorphismen mit der Allelnomenklatur [Kimura et al., 1989, offiziell M33388] verglichen.

Im Anschluss wurden in Anlehnung an die o.g. Verfahren die Phänotypen bestimmt. Es wurde ein vereinfachtes Punktesystem verwendet. Hierbei erhielten Nullallele den Wert 0, vermindert aktive Allele den Wert 0,5 und vollfunktionsfähige Allele den Wert 1. Im Falle einer Duplikation wurde der Wert 2 vergeben. In Folge der Punktwertvergabe konnte die Zuordnung der Metabolisierungstypen vorgenommen werden. Die Zuordnung zum *Poor Metabolizer*-Status erfolgte im Falle einer Deletion oder dem Vorhandensein zweier Nullallele. Den *Intermediate Metabolizer*-Status erhielten Patienten mit einem Punktwert <2. Zum *Extensive-Metabolizer* gehörten Probanden mit dem Wert 2 für 2 aktive Allele. Einen *Ultrarapid-Metabolizer* bestimmten wir bei einem Wert >2.

Zum allgemeinen Verständnis wird nachfolgend ein Beispiel aufgeführt: Im Falle der Allelkonstellation \*1/\*2 wurde ein EM-Status angenommen, da beide Allele aktive Enzyme haben. Wurde eine \*4/\*4-Allelkonstellation detektiert, so erfolgte die Zuordnung zum PM-Status aufgrund zweier beteiligter Nullallele.

## 3. Ergebnisse

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientencharakterisierung

Insgesamt wurden 97 Patienten, die postoperativ an Übelkeit oder Erbrechen litten, in die Studie eingeschlossen. Es musste entweder ein aktuelles PONV-Ereignis vorliegen oder die glaubhafte Eruierung von mindestens zweimalig stattgehabten ausgeprägten PONV-Ereignissen in der Eigenanamnese vorliegen.

Bei einer durchschnittlichen Anästhesiezeit von 150 min. unterzogen sich 22 Patienten Operationen im Bauchbereich und 7 Patienten im Extra-/Retroperitonealraum. Periphere traumatologische Eingriffe wurden an 23 Patienten vorgenommen, im Gesichts- und Halsbereich an 12 und neurochirurgische Eingriffe an 5 Patienten. Eingriffe im Thoraxraum kamen 2 mal vor und sonstige Eingriffe 26 mal.

Eine Auflistung der Mediane von Alter, BMI, ASA-Status und ermitteltem PONV-Risikoscore nach Apfel et al., 1999, liefert Tabelle 3.1.

	Median (Min-Max)
Alter (in Jahre)	59 (16-85)
Body Mass Index in kg/m <sup>2</sup>	25,7 (16,7-40,3)
ASA	II (I-III)
Risikoscore PONV (n. Apfel et al., 1999)	3 (0-4)

Tabelle 3.1: Angabe der Medianwerte von Alter, BMI, ASA-Status und PONV-Risikoscores der 97 eingeschlossenen Patienten

Ein Großteil der Probanden war weiblich (71%), Nichtraucher (84%) und hatte eine positive PONV-Anamnese (73%).

	n (%)
Weibliches Geschlecht	71
Nichtraucher	84
poNV in Anamnese	73
Postoperative Opioidgabe (24h)	53
Intraoperative PONV-Prophylaxe	47

Tabelle 3.2: Häufigkeiten von PONV Risikofaktoren nach Apfel (2004) sowie einer durchgeführten antiemetischen Prophylaxe in der untersuchten Studiengruppe (n=97)

## 3. Ergebnisse

---

Bei allen Patienten erfolgte eine komplette Gensequenzierung des CYP2D6. Zusätzlich wurde bei jedem nach Duplikationen und der Deletion (Allel \*5) des CYP2D6 gesucht.

### 3.2. Ergebnisse Genotypisierung CYP2D6

#### 3.2.1 Nachgewiesene genetische Varianten im CYP2D6 Gen

Pro Patient wurden insgesamt etwa 4500 Basenpaare der Gensequenz im CYP2D6 mit den anschließenden untranslatierten Regionen des 3'- und 5'-Endes analysiert.

Die Sequenzierung des Genlocus von CYP2D6 auf dem Chromosom 22q 13.1 erfolgte nach Kimura et al., 1989. Alle Basennummerierungen beziehen sich auf diese Referenz-Sequenz (in der NCBI-Datenbank als M33388 gekennzeichnet). Nachfolgend wurden die detektierten genetischen Varianten der Allelnomenklatur nach [www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm) zugeordnet. In Tab. 3.3 sind die nachgewiesenen Polymorphismen zusammengefasst.

Mit 55,15% konnte am häufigsten der Basenaustausch G>C an der Stelle 4180 detektiert werden. In homozygoter Form fand er sich 30 mal, in heterozygoter Form 47 mal. Er ist phänotypisch häufig mit einer normalen Enzymaktivität assoziiert [Marez et al., 1997; Sachse et al., 1997] und kommt bei den Allelen CYP2D6\*2, -\*4, -\*10, -\*17 und -\*64 vor.

Der Basenaustausch C>T an der Position 2850 trat am zweithäufigsten auf. Er war 40 mal heterozygot und 10 mal homozygot zu detektieren. Phänotypisch ist er mit dem EM-Status assoziiert. Er kommt bei folgenden CYP2D6-Allelen vor: -\*2,\*8,\*11,\*12,\*14,\*17,\*19-\*21,\* 28,\*29-\*32,\*34,\*35,\*40-\*42,\* 45,\* 46,\*51,\*55,\*56,\*58,\*59,\*63,\*65,\*69.

An dritter Stelle der Häufigkeit stand die CYP2D7 Konversion im Intron 1 (214-245). Sie fand sich 38 mal heterozygot und 10 mal homozygot. Ihr Auftreten ist nach Johansson et al. meist mit dem EM-Allel -\*2 verbunden [Johansson et al., 1993]. Ebenfalls tritt sie bei folgenden Allelen auf: -\*21,\*31,\*41,\*51,\*56 und \*58.



### 3. Ergebnisse

CYP2D6-Polymorphismen	he	ho	$\sigma$	Häufigkeit in % (bezogen auf 194 Chromosomen)
7 conversion Intron 1	38	10	58	29,89
19 G>A	1	0	1	0,515
31 G>A	9	2	13	6,7
77 G>A	5	0	5	2,57
82 C>T	1	0	1	0,515
100 C>T	34	6	46	23,71
138 ins T	8	0	8	4,12
1023 C>T	3	0	3	1,54
1659 G>A	1	0	1	0,515
1704 C>G	1	0	1	0,515
1707 del T	2	0	2	1,03
1758 G>T	1	0	1	0,515
1758 G>A	2	0	2	1,03
1846 G>A	32	5	42	21,64
2483 G>T	4	0	4	2,06
2549 del A	2	0	2	1,03
2573 ins C	1	0	1	0,515
2613-2615 del AGA	1	0	1	0,515
2850 C>T	40	10	60	30,92
2935 A>C	2	0	2	1,03
3183 G>A	1	0	1	0,515
3853 G>A	2	0	2	1,03
4180 G>C	47	30	107	55,15

Tabelle 3.3: Angabe und Häufigkeit der nachgewiesenen Polymorphismen, Bezeichnung nach der Allelnomenklatur M33388 der NCBI-Datenbank, einsehbar unter [www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm). (he=heterozygot, ho=homozygot,  $\sigma$ =hetero- und homozygot zusammen)

Der Austausch C>T an der Stelle 100 fand sich 46-mal, davon waren 6 homozygot und 34 heterozygot. Er findet sich meistens bei CYP2D6-Allelen mit verminderter Enzymaktivität in den Allelen: -\*4, \*10, \*14, \*36, \*37, \*47, \*49, \*54, \*56, \*57, \*64, \*65, \*69 und \*72.

Der Polymorphismus G>A im Intron fand sich insgesamt 42-mal, davon waren 32 SNP's hetero- und 5 SNP's homozygot. Aus ihm resultiert ein Splice-Defekt. Phänotypisch wird er zum PM-Status gezählt und tritt im Allel \*4 auf.

### 3. Ergebnisse

Insgesamt entsprach die Häufigkeitsverteilung der detektierten Polymorphismen im Probandenkollektiv jener in der kaukasischen Bevölkerung (Abb. 7) im Vergleich zu den Angaben von Marez et al., 1997.

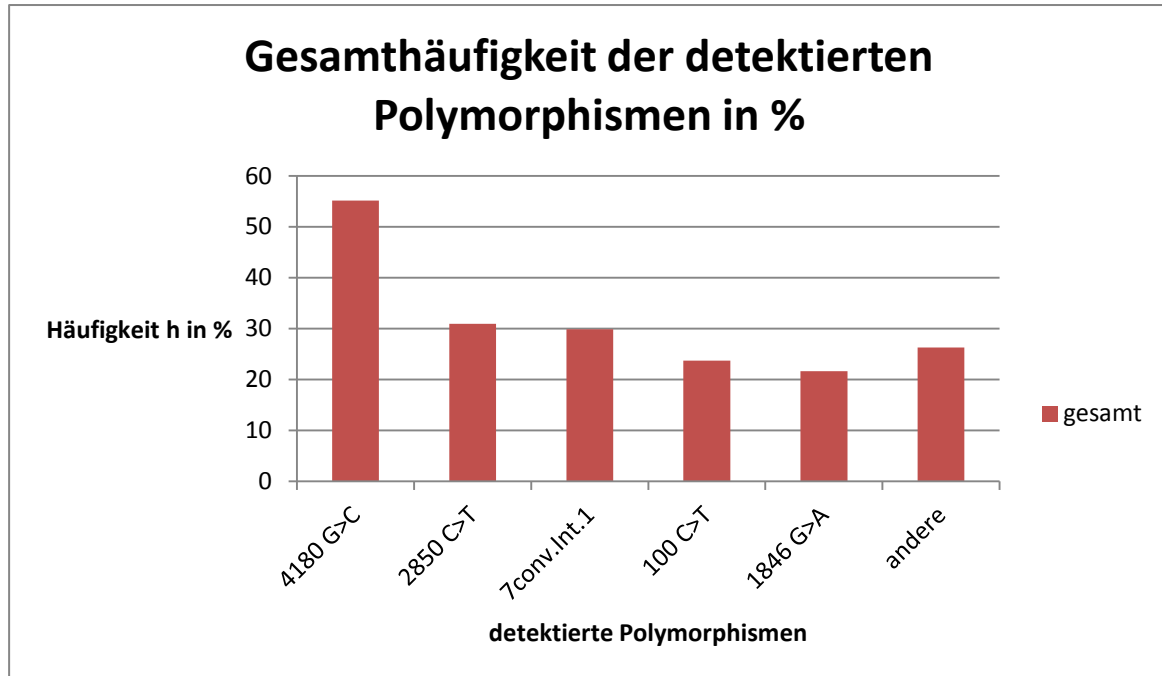


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der detektierten Polymorphismen in der Gesamtpopulation in Prozent

#### 3.2.2 Häufigkeitsverteilung der detektierten CYP2D6-Allele

Die Allelzuordnung erfolgte durch Zuordnung der detektierten Polymorphismen. Es wurde die offizielle Allelnomenklatur verwendet, welche im Internet unter [www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm) zu finden ist.

Die bei den 97 Probanden nachgewiesenen 22 verschiedenen Allele des CYP2D6 sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Duplizierte Allele wurden zweifach gezählt. Es wurden sechs Duplikationen nachgewiesen. Hieraus resultierte in 3 Fällen eine ultraschnelle Metabolisierungskapazität.

### 3. Ergebnisse

Allele(n=22) – laut Nomenklatur M33388 der NBCI-Datenbank	Anzahl	Häufigkeit in % (bezogen auf 194 Chromosomen)
*1	55	28,35
*2	38	19,58
*3	2	1,03
*4	23	11,85
*5	4	2,06
*6	2	1,03
*7	2	1,03
*9	1	0,515
*10	10	5,15
*13	5	2,57
*15	2	1,03
*17	3	1,54
*21	1	0,515
*22	1	0,515
*27	1	0,515
*28	1	0,515
*29	1	0,515
*32	1	0,515
*33	4	2,06
*34	1	0,515
*35	7	3,61
*39	5	2,57

Tabelle 3.4: Aufführung der 22 verschiedenen Allele, welche bei allen 97 Patienten nachgewiesen wurden mit Angabe der absoluten Häufigkeit in Prozent

Mit 28,35% wurde das Wildtyp-Allel \*1 als das häufigste nachgewiesen. Das Allel \*2 fand sich mit einer Häufigkeit von etwa 19,58%. Das Wildtypallel und Allel \*2 werden dem EM-Status (*Extensive Metabolizer*) zugeordnet. Das PM-Allel \*4 wurde mit einer Häufigkeit von 11,85% nachgewiesen.

Mit der Long-PCR nach Steen et al. [1995a] konnten 4 Deletionen im Probandengut detektiert werden. Hiervon hatten 3 Patienten ein zusätzliches Nullallel und 1 Patient ein Wildtyp-Allel.

#### 3.2.3 Genotypen und Metabolisierungskapazität

In Tabelle 3.5 wurden die Allelverteilung und der Metabolisierungstyp in der gesamten Untersuchungsgruppe zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse

Allelkonstellation	Metabolisierungstyp	Vorkommen (bei gesamt n=97)	Häufigkeit in %
*1/*1	EM	12	12,36
*1/*2	EM	12	12,36
*1/*2 und Dup.	UM	2	2,06
*1/*4	IM	9	9,27
*1/*4 und Dup.	EM	1	1,03
*1/*5	IM	1	1,03
*1/*7	IM	1	1,03
*1/*10	EM	2	2,06
*1/*13 und Dup.	EM	1	1,03
*1/*21	IM	1	1,03
*1/*28	EM	1	1,03
*1/*33	EM	1	1,03
*1/*34	EM	1	1,03
*1/*35	EM	1	1,03
*1/*39	EM	3	3,09
*2/*2	EM	4	4,12
*2/*4	IM	5	5,15
*2/*10	IM	2	2,06
*2/*15 und Dup.	EM	1	1,03
*2/*29	EM	1	1,03
*2/*33	EM	1	1,03
*2/*35	EM	3	3,09
*2/*35 und Dup.	UM	1	1,03
*3/*4	PM	2	2,06
*4/*4	PM	5	5,15
*4/*5	PM	2	2,06
*4/*6	PM	2	2,06
*4/*7	PM	1	1,03
*4/*9	IM	1	1,03
*4/*10	IM	2	2,06
*4/*13	PM	1	1,03
*4/*15	PM	1	1,03
*4/*27	IM	1	1,03
*4/*32	PM	1	1,03
*4/*33	PM	1	1,03
*4/*35	IM	1	1,03
*4/*39	IM	2	2,06
*10/*10	IM	2	2,06
*5/*33	IM	1	1,03
*13/*17	PM	3	3,09
*22/*35	EM	1	1,03

Tab.3.5: Detektierte Allelkonstellation und resultierender Metabolisierungstyp der gesamten Untersuchungsgruppe (Dup.=Duplikation, EM=Extensive Metabolizer, IM=Intermediate Metabolizer, UM=Ultrarapid Metabolizer, PM=Poor Metabolizer)

### 3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 42 verschiedene Allelkonstellationen bei den 97 Patienten gefunden.

Am häufigsten fanden sich die Allelkonstellationen \*1/\*1 und \*1/\*2, welche mit dem EM-status einhergehen. Es wurden sechs Duplikationen detektiert. Hiervon hatten drei den UM-Status und drei den EM-Status. Es wurden vier Deletionen detektiert, hiervon waren drei *Poor Metabolizer* und ein *Intermediate Metabolizer*.

In Abb. 8 wird die Häufigkeitsverteilung der vier Metabolisierungstypen in der Probandenpopulation aufgezeigt.

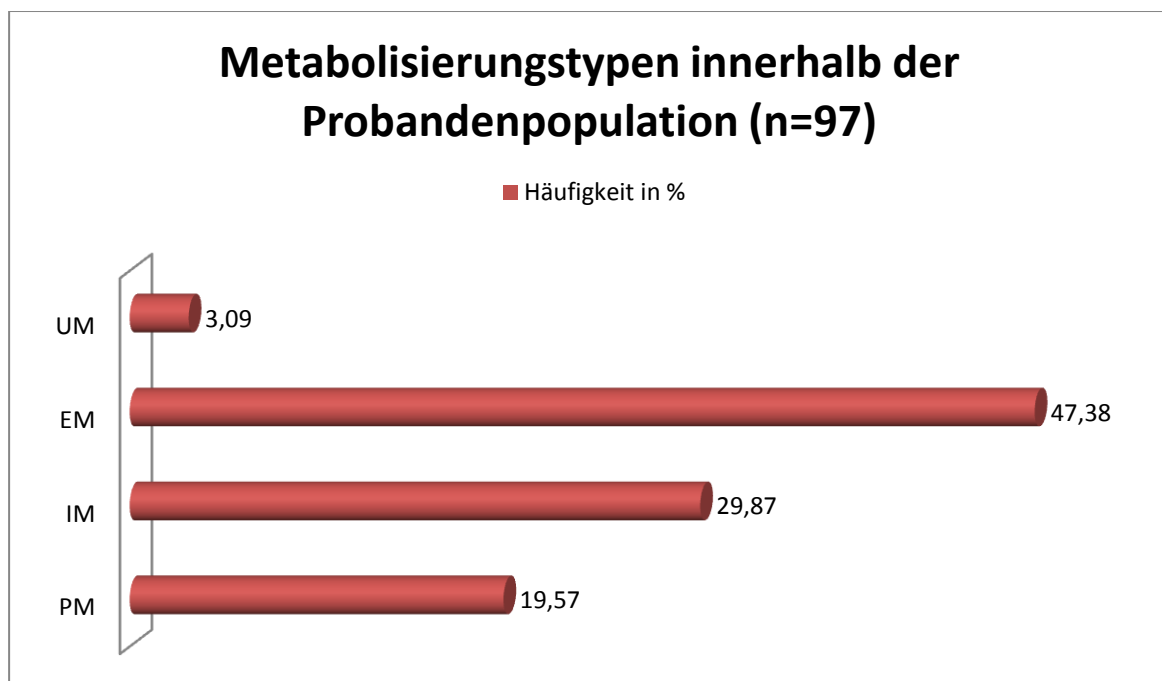


Abb. 8: Verteilung der detektierten Metabolisierungstypen innerhalb der gesamten Untersuchungsgruppe (n=97)

Die geschlechtsbezogene Verteilung der Metabolisierungstypen ist in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Genotyp	gesamt	Häufigkeit in %	Frauen	Häufigkeit in %	Männer	Häufigkeit in %
PM	19	19,57	11	11,33	8	8,24
IM	29	29,87	22	22,66	6	6,18
EM	46	47,38	35	36,05	12	12,36
UM	3	3,09	3	3,09	0	0
Gesamt	97		71	73,13	26	26,78

Tabelle 3.6: Metabolisierungstypen und deren Geschlechterverteilung in Bezug zur Gesamtpopulation (n=97)

### 3. Ergebnisse

---

Es ergab sich in der Gesamtpopulation folgende Verteilung der Metabolisierungstypen (s.a. Abb. 3.2):

Der EM wurde als häufigster Typ nachgewiesen, sowohl in der Gesamt-, als auch in der geschlechtsspezifischen Kohorte. Als zweithäufigster Metabolisierungstyp trat der IM in der Gesamt- und weiblichen Studiengruppe in Erscheinung, gefolgt vom PM-Typ.

UM's wurden am seltensten und nur bei Frauen nachgewiesen.

#### **3.3. Ausmaß von PONV nach applizierter antiemethischer Therapie mit Ondansetron und Dexamethason**

Alle Patienten hatten eine mindestens 150 minütige Operation unter balancierter Anästhesie. Als volatile Anästhetika wurden Isofluran, Sevofluran oder Desfluran eingesetzt.

Bei Patienten mit einem berechneten PONV-Risikoscore von  $\geq 2$  erfolgte eine Emesisprophylaxe mit einem Serotoninrezeptor-Antagonisten, welcher über das Enzym CYP2D6 verstoffwechselt wird. Zusätzlich erfolgte die Gabe von Dexamethason. Von 97 Patienten erhielten n=47 die PONV-Prophylaxe.

Bezüglich der Gesamtuntersuchungsgruppe ließen sich postoperativ folgende Ereignisse feststellen: 43 Patienten hatten ein postoperatives PONV Ereignis. Bei 54 Patienten mit positiver PONV-Anamnese trat kein PONV-Ereignis ein.

Zur näheren Differenzierung bezüglich der intraoperativen applizierten Emesisprophylaxe wurden die 97 Patienten zwei Gruppen zugeteilt. Die Teilnehmer der Gruppe 0 erhielten aufgrund des ermittelten PONV-Risikos keine PONV-Prophylaxe (n=50). In Gruppe 1 (n=47) erhielten alle Patienten eine Emesisprophylaxe in Form von Serotoninrezeptorantagonisten in Kombination mit dem CYP2D6-induzierenden Dexamethason.

Abschließend sollten das PONV-Auftreten und die Verteilung der Metabolisierungstypen der gesamten Population betrachtet werden. Hierbei wurde die Gabe einer potentiellen Emesisprophylaxe vernachlässigt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.1. Analyse der Gruppe ohne PONV-Prophylaxe (Gruppe 0)

##### 3.3.1.1. Verteilung der Metabolisierungstypen in Gruppe 0

Aus der Gesamtprobandenpopulation erhielten 50 Patienten aufgrund des mittels PONV-Risikoscores ermittelten PONV-Risikos keine Prophylaxemedikation. Diese Patienten wurden in der Gruppe 0 zusammengefasst.

Abbildung 9 veranschaulicht die Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der Gruppe 0.

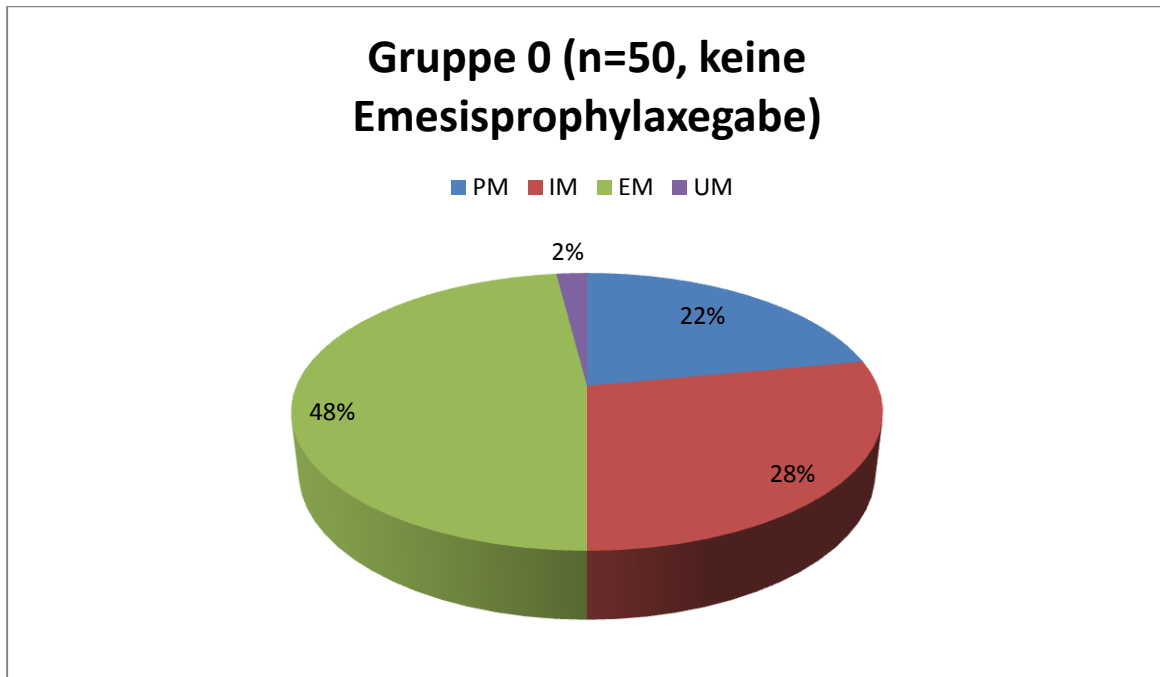


Abb. 9: Häufigkeit des jeweiligen Metabolisierungstypes bei den 50 Patienten, welche keine PONV Prophylaxe erhielten

In Tabelle 3.7 werden die CYP2D6-Metabolisierungstypen nach der Gesamthäufigkeit und Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppe 0 zusammengefasst. Zur diesbezüglichen graphischen Veranschaulichung s. Abb. 3.4 und Abb. 3.5.

Gruppe 0 (n=50)				
Metabol.	Frau (n=28)	Mann (n=22)	ges. (n=50)	Häufigk. In % (n=50)
PM	4	7	11	22
IM	8	6	14	28
EM	15	9	24	48
UM	1	0	1	2

Tabelle 3.7: Häufigkeit der gefundenen Metabolisierungstypen mit Angabe der Geschlechterverteilung und Gesamthäufigkeit innerhalb Gruppe 0 (n=50 Pat., welche keine Emesisprophylaxe erhielten)

### 3. Ergebnisse

Am häufigsten konnte in Gruppe 0 mit 48% der Status des *Extensive Metabolizers* (EM) gefunden werden. Am zweithäufigsten trat der *Intermediate Metabolizer* (IM) mit 28% auf. Einen defizienten Enzymstatus wiesen 22% in Form des *Poor Metabolizer*-Status auf (PM). Mit 2 % am seltensten trat der *Ultrarapid Metabolizer* (UM) bei einer weiblichen Patientin auf.

Nachfolgend war von Interesse, welche Patienten ohne PONV Prophylaxe tatsächlich postoperativ Übelkeit u.o. Erbrechen entwickelten und wie sich deren Metabolisierungsspektrum darstellte:

Von 50 Patienten ohne Emesisprophylaxe erlitten 18 kein PONV-Ereigniss nach dem operativen Eingriff (s.a. Abb. 10). Hiervon waren 11 Frauen und 7 Männer. Bei 27,77% von ihnen lag ein genotypischer PM-Status vor, 11,11% trugen den IM-Status und deutlich mehr als die Hälfte hatten mit 61,11% den Status der *Extensive Metabolizers* (EM).

Bei 32 von 50 Probanden, die intraoperativ keine antiemetische Prophylaxe erhielten, traten postoperative Übelkeit und Erbrechen auf (s.a. Abb. 11). Hierunter waren 17 Frauen und 15 Männer. Bei 18,75% von ihnen lag ein genotypischer PM-Status vor, 37,5% trugen den IM-Status und 40,63% hatten den EM-Status. Mit 3,13% trat der UM-Status auf.

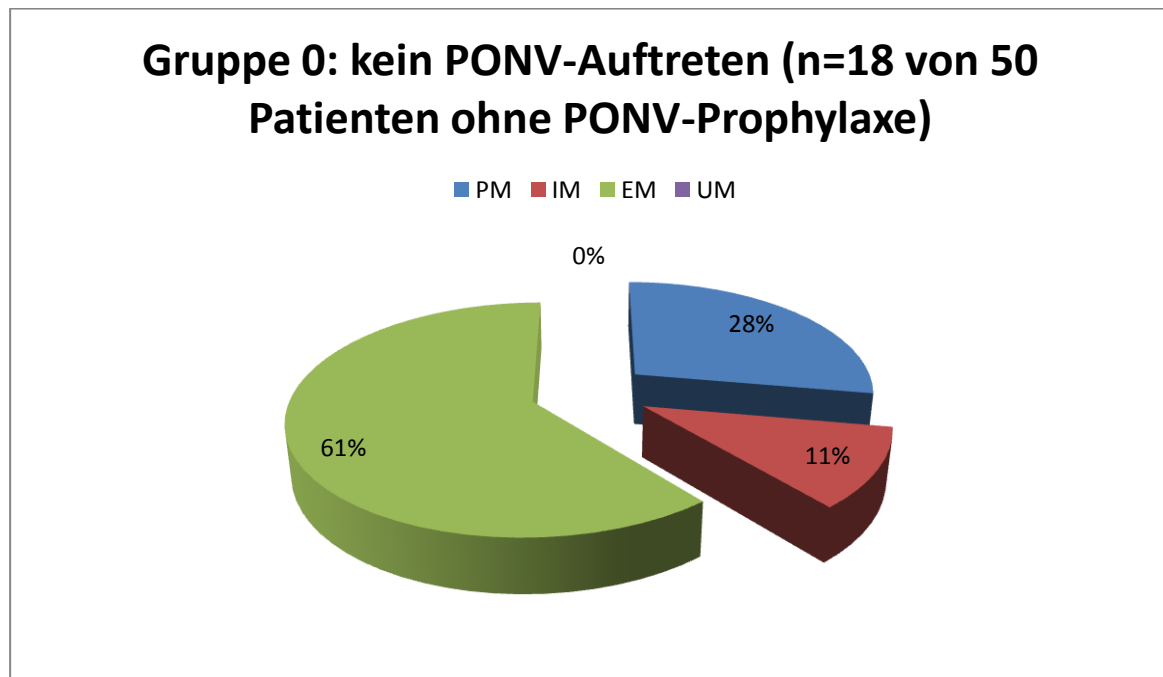


Abb.10: Metabolisierungstypen von 18 Patienten, welche kein PONV-Ereignis ohne medikamentöse PONV Prophylaxegabe hatten



### 3. Ergebnisse

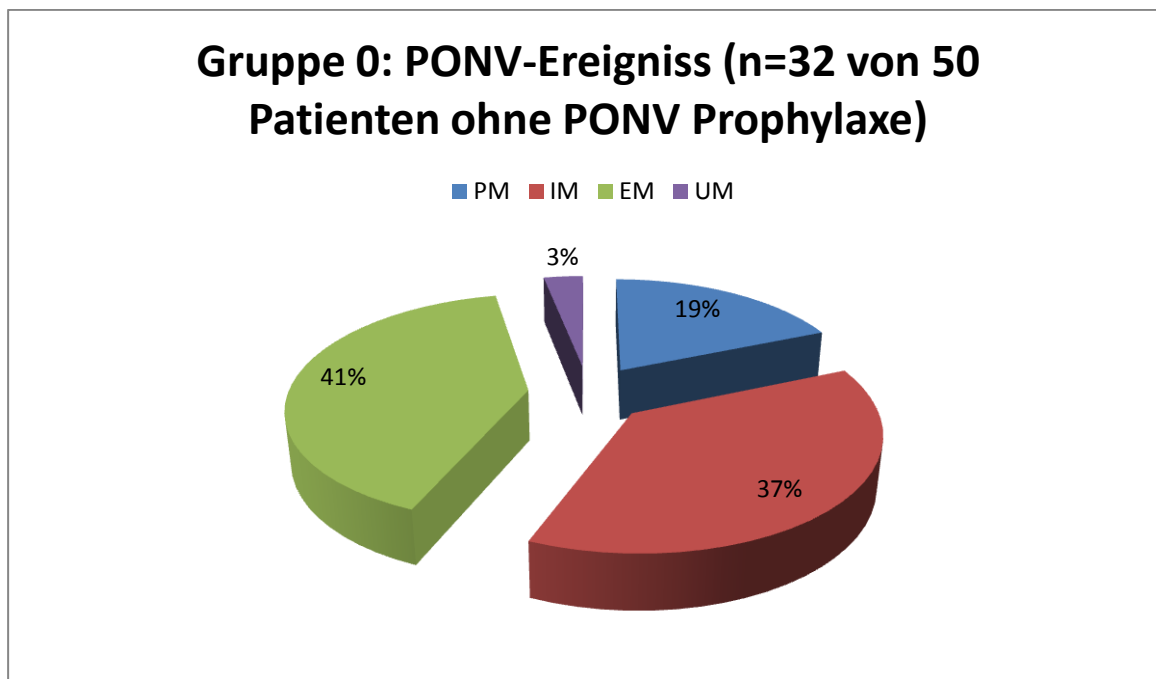


Abb. 11: Metabolisierungstypen von 32 Patienten, welche ein aktuelles PONV-Ereignis ohne medikamentöse PONV Prophylaxegabe hatten

In Tab. 3.8 wurden die Ereignisse „PONV“ bzw. „kein PONV“ bei denjenigen Patienten zusammengefasst, die keine antiemetische Prophylaxe erhielten (Gruppe 0).

Kein PONV (n=18)					PONV (n=32)					Signifi- Kanz
Meta- bol.	Frau	Mann	ges.	Häufgk. %	Meta- bol.	Frau	Mann	ges.	Häufgk. %	p-Wert
PM	2	3	5	27,77	PM	2	4	6	18,75	0,159
IM	1	1	2	11,11	IM	7	5	12	37,5	
EM	8	3	11	61,11	EM	7	6	13	40,63	
UM	0	0	0	0	UM	1	0	1	3,13	
ges.	11	7	18		ges.	17	15	32		
Frauen: p=0,260, Männer: p=0,734										

Tabelle 3.8: Auftreten von PONV und Metabolisierungstypen bei n=50 Patienten ohne Erhalt einer Prophylaxemedikation (Gruppe 0). Hierbei haben sich die Metabolisierungstypen nicht signifikant auf das PONV-Auftreten ausgewirkt (p=0,159). Ebenfalls bei der geschlechtsbezogenen Betrachtung ließ sich keine Signifikanz im PONV-Auftreten in Bezug auf die verschiedenen Metabolisierungstypen nachweisen (Frauen: p=0,260; Männer: p=0,734; Fisher's Exakter Test)

Insgesamt war in der Patientengruppe 0 kein signifikanter Unterschied in den Subgruppen (PONV-Ereignis ja/nein) bezüglich der CYP2D6-Enzymaktivitäten feststellbar. Das

### 3. Ergebnisse

Vorhandensein eines jeden Metabolisierungstyps führte sowohl in der gesamten als auch in der geschlechtsbezogenen Betrachtung zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich PONV.

#### 3.3.1.2. Gruppenunterschiede in Gruppe 0 (keine PONV-Prophylaxegabe)

Gruppenmerkmal	Kein PONV (n=18)	PONV (n=32)	Signifikanz: p-Wert
Altersmedian in Jahren	57 (28-73J.)	61,5 (22-85J.)	0,585
Geschlecht	11 Frauen, 7 Männer	17 Frauen, 15 Männer	0,768
BMI in kg/m <sup>2</sup>	26,71 (21,3-39,8)	26,1 (22,2-36,1)	0,900
Art der OP	Abdomen: 6 Trauma: 6 Hals+Kopf: 0 Retroperitoneum: 1 Haut: 0 Neuro: 0 Thorax: 1 Sonstige: 4	Abdomen: 10 Trauma: 6 Hals+Kopf: 7 Retroperitoneum: 4 Haut: 2 Neuro: 1 Thorax: 0 Sonstige: 2	0,087
Raucher	4	5	0,705
PONV in Anamnese	15	13	0,007
Postop.Opioidgabe	9	17	1,000

Tabelle 3.9: Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale innerhalb Gruppe 0 zwischen Patienten mit Auftreten von PONV (n=32) und Patienten ohne Auftreten von PONV (n=18); Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ; PONV-Anamnese, Fischer's Exakter-Test. Alter und BMI, U-Test nach Mann und Whitney, exakt berechnet

In Tabelle 3.9 findet sich eine Gegenüberstellung der allgemeinen Gruppenmerkmale zwischen den Patienten ohne Emesisprophylaxe mit Auftreten und Nichtauftreten von PONV.

Insgesamt waren die Patienten mit Auftreten von PONV ohne vorherige Emesisprophylaxe im Median 4,5 Jahre älter. Anhand der p-Werte lässt sich feststellen, dass das Alter und das Geschlecht keine Signifikanz bezüglich des PONV-Auftretens darstellen. Bezüglich der Gewichtsverteilung findet sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Die Unterschiede im PONV-Auftreten der Gruppe 0 in Bezug auf die OP-Art, Raucherstatus oder postoperative Opioidgabe lagen ebenfalls im Zufallsbereich.

Dagegen zeigte sich eine Signifikanz im Auftreten von PONV in Bezug auf eine positive PONV-Anamnese, überraschenderweise jedoch in der Form, dass bei stattgehabtem PONV-Ereignis in der Vergangenheit weniger Patienten PONV entwickelten, auch wenn sie keine antiemetische Prophylaxe erhielten ( $p=0.007$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.2. Gruppe mit PONV-Prophylaxe (Gruppe 1)

##### 3.3.2.1. Verteilung der Metabolisierungstypen in Gruppe 1

Von 97 Patienten der gesamten Untersuchungsgruppe, erhielten n=47 Patienten eine kombinierte PONV Prophylaxe mit einem Setron (5HT3-A-Antagonist) und Dexamethason. Diese Patienten wurden in Gruppe 1 zusammengefasst. Tabelle 3.10 zeigt die Geschlechterverteilung und das Auftreten der detektierten Metabolisierungstypen. In Abb.12 wird die Verteilung der Metabolisierungstypen aller 47 Patienten der Gruppe 1 veranschaulicht.

Gruppe 1 (n=47)				
Metabol.	Frau (n=43)	Mann (n=4)	ges. (n=47)	Häufigk. in % (n=47)
PM	7	1	8	16,96
IM	14	0	14	29,68
EM	20	3	23	48,76
UM	2	0	2	4,24

Tabelle 3.10: Häufigkeit der gefundenen Metabolisierungstypen mit Angabe der Geschlechterverteilung und Gesamthäufigkeit innerhalb Gruppe 1 (n=47 Pat. nach Emesisprophylaxe)

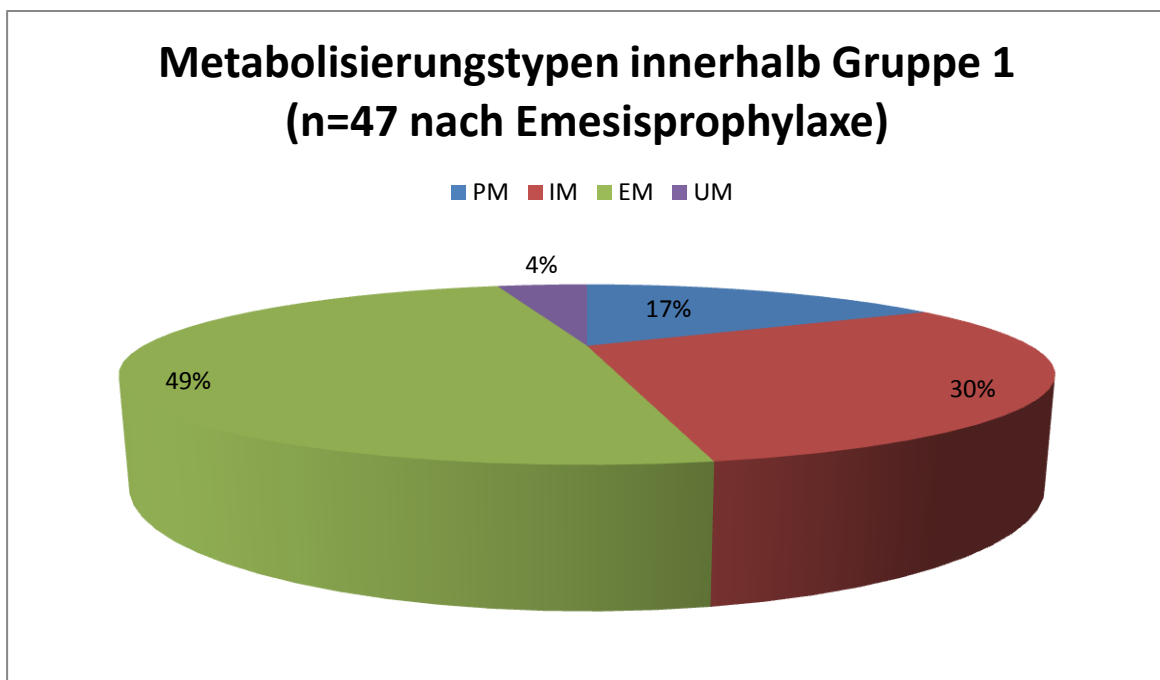


Abb.12: Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der gesamten Gruppe 1 (n=47), welcher eine kombinierte PONV Prophylaxe appliziert wurde

Am häufigsten konnte mit 48,76% der Status des *Extensive Metabolizers* (EM) gefunden werden. Am zweithäufigsten trat der *Intermediate Metabolizer* (IM) mit 29,68% auf.

### 3. Ergebnisse

Einen defizienten Enzymstatus wiesen 16,96%, davon 7 Frauen und 1 Mann, in Form des *Poor Metabolizer*-Status auf (PM) auf. Mit 4,24 % am seltensten trat der *Ultrarapid Metabolizer* (UM) bei 2 weiblichen Patientinnen auf.

Postoperativ wurden die Ereignisse „aktuelles PONV“ oder „kein Auftreten von PONV“ dokumentiert. In Tabelle 3.11 wurden die Ereignisse und nach Zuweisung der Allele abgeleiteten Metabolisierungstypen aufgeführt.

Kein PONV					PONV					Signifikanz
Meta- bol.	Frau	Mann	ges.	Häufigk. % von n=30	Meta- bol.	Frau	Mann	ges.	Häufigk. % von n=17	p-Wert
PM	3	0	3	9,99	PM	4	1	5	29,4	p=0,418
IM	10	0	10	33,33	IM	4	0	4	23,52	
EM	13	3	16	53,28	EM	7	0	7	41,16	
UM	1	0	1	3,33	UM	1	0	1	5,88	
GESAMT	27	3	30			16	1	17		
Häufig- keit in % von n=30	89,9	9,99				94,08	5,88			
Frauen: p=0,656, Männer: p=0,250										

Tabelle 3.11: Auftreten von PONV und Metabolisierungstypen bei n=47 Patienten mit Erhalt einer Prophylaxemedikation (Gruppe 1); hierbei haben sich die Metabolisierungstypen nicht signifikant auf das PONV-Auftreten ausgewirkt (p=0,418), ebenfalls bei der geschlechtsbezogenen Betrachtung ließ sich keine Signifikanz im PONV-Auftreten in Bezug auf die verschiedenen Metabolisierungstypen nachweisen (Frauen: p=0,656; Männer: p=0,250; Fisher's Exakter Test)

Von 47 Patienten erlitten 30 kein PONV nach operativem Eingriff mit kombinierter Emesisprophylaxegabe (Abb. 13). Bei 9,99% von ihnen lag ein genotypischer PM-Status vor, 33,33% trugen den IM-Status und 53,28% den EM-Status. Eine Frau wies den UM-Status auf, das entspricht 3,33% von 30 Patienten ohne PONV-Auftreten nach Emesisprophylaxegabe.

Bei 17 von 47 Probanden traten postoperative Übelkeit und Erbrechen trotz vorheriger Emesisprophylaxegabe auf, s.a. Abb. 14. Hiervon waren 16 weiblich und 1 Proband männlich. Bei 29,4% von Ihnen lag ein genotypischer PM-Status vor, 23,52% trugen den IM-Status und

### 3. Ergebnisse

---

41,16% hatten den EM-Status. Mit 5,88% kam bei einer weiblichen Patientin der UM-Status vor.

Nach statistischer Analyse musste festgestellt werden, dass die Unterschiede im PONV-Auftreten in Bezug zur Geschlechterverteilung im Zufallsbereich lagen. Die Wahrscheinlichkeit, dass PONV hier zufällig auftrat, betrug 41%.

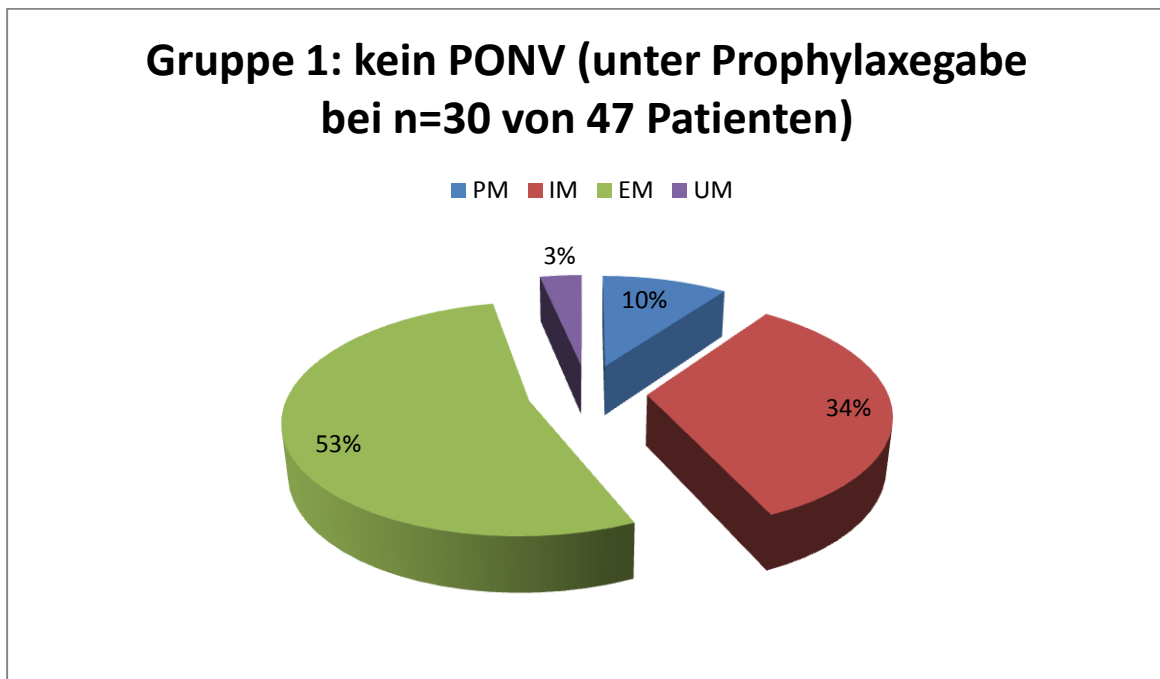


Abb. 13: Darstellung der vorkommenden Metabolisierungstypen bei 30 von 47 Patienten, welche eine Emesisprophylaxegebe erhielten und kein PONV entwickelten

### 3. Ergebnisse

---

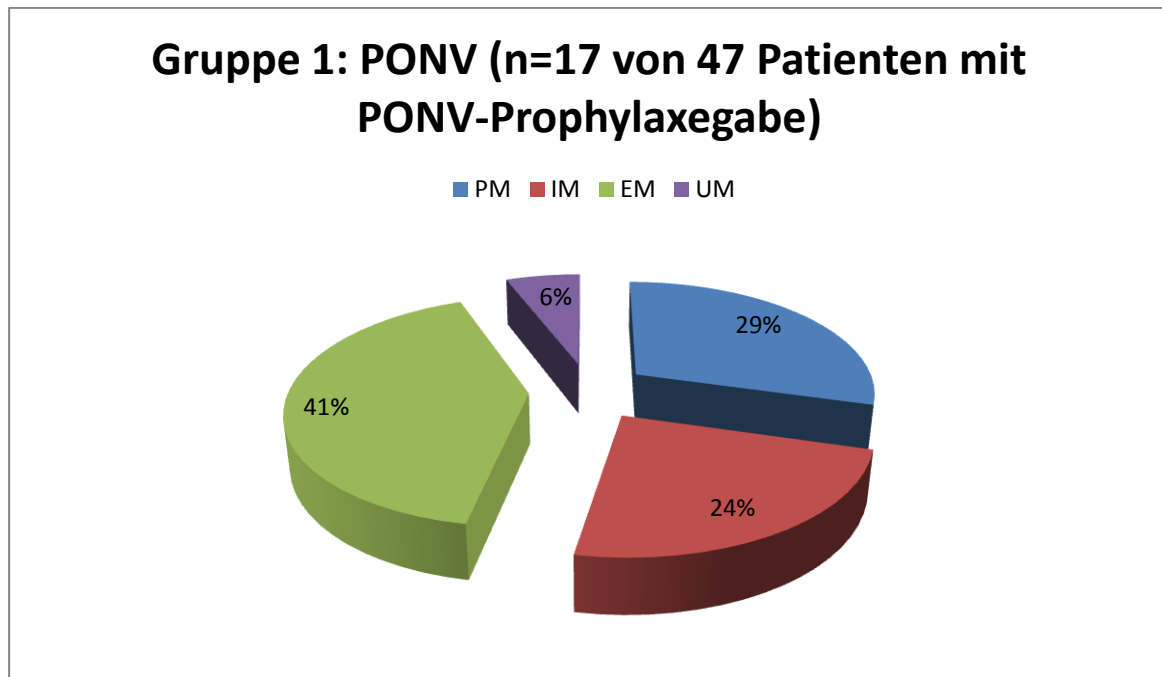


Abb. 14: Darstellung der vorkommenden Metabolisierungstypen bei 17 von 47 Patienten, welche eine Emesisprophylaxegebe erhielten und ein PONV-Ereignis entwickelten

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.2.2. Gruppenunterschiede innerhalb der Gruppe 1 (applizierte PONV-Prophylaxe)

Die allgemeinen Gruppenunterschiede sind der Tab. 3.12 zu entnehmen.

Gruppenmerkmal	Kein poNV (n=30): 63,8%	poNV (n=17): 36,17%	p-Wert
Altersmedian in Jahren	51,5 (16-78J.)	64,0 (36-79J.)	0,027
Geschlecht	27 Frauen, 3 Männer	16 Frauen, 1 Mann	1,000
BMI in kg/m <sup>2</sup>	25,0 (16,76-40,37)	24,96 (19,8-32,56)	0,943
Art der OP	Abdomen: 9 Trauma: 11 Hals+Kopf: 6 Retroperitoneum: 1 Haut: 1 Neuro: 0 Thorax: 1 Sonstige: 1	Abdomen: 5 Trauma: 5 Hals+Kopf: 5 Retroperitoneum: 0 Haut: 0 Neuro: 1 Thorax: 0 Sonstige: 1	0,921
Raucher	5	0	0,143
PONV in Anamnese	29	12	0,018
Postoperative Opioidgabe	20	7	0,127

Tabelle 3.12: Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale innerhalb Gruppe 1 zwischen Patienten mit Auftreten von PONV (n=14) und Patienten ohne Auftreten von PONV (n=33); die p-Werte beziehen sich darauf, ob das Vorhandensein eines Gruppenmerkmals zu PONV prädisponiert, hierbei war das Vorhandensein einer PONV-Anamnese signifikant für die geringere PONV-Inzidenz in Gruppe 1 (p=0,018; Chi-Quadrat Test, exakt berechnet), ebenfalls waren die Patienten mit PONV signifikant älter (p=0,027; für den Vergleich von Alter und BMI wurde jeweils der Mann-Whitney-U-Test, exakt berechnet, verwendet)

Innerhalb der Gruppe 1 lag der Altersmedian bei 55 Jahren (jüngster Patient 16, ältester Patient 79 Jahre alt). Die Probanden der Gruppe 1 mit aktuellem PONV-Ereignis waren signifikant älter (p=0.027).

Bei der Gewichtsverteilung lag im Durchschnitt ein BMI von ca. 25kg/m<sup>2</sup>, welcher einem Normalgewicht entspricht, vor. Eine Signifikanz gegenüber dem Auftreten von PONV ließ sich hierbei nicht eruieren.

Die Art der OP, der Raucherstatus sowie die postoperative Opioidapplikation waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Über PONV in Anamnese berichteten 41 Patienten. Diese hatten signifikant seltener ein aktuelles PONV-Ereignis (p=0,018).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.3. PONV - Auftreten unabhängig von einer applizierten Emesisprophylaxe im gesamten Patientengut

Bisher wurde das Auftreten von PONV in Beziehung zu den CYP2D6-Metabolisierungstypen gesetzt (s.o.). Die Einteilung zu den Subgruppen 0 und 1 wurde aufgrund der Verabreichung einer PONV-Prophylaxe vorgenommen. An dieser Stelle soll eine von der Emesisprophylaxegabe unabhängige Betrachtung stattfinden. Von 97 Patienten entwickelten 49 Patienten postoperativ ein PONV-Ereignis.

##### 3.3.3.1. Verteilung der Metabolisierungstypen im gesamten Patientengut (unabhängig von einer PONV-Prophylaxe)

Die Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der Gesamtpopulation wird in Abb. 3.2 dargestellt.

In Abb. 15 wird die Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der 48 Patienten veranschaulicht, welche kein PONV hatten.

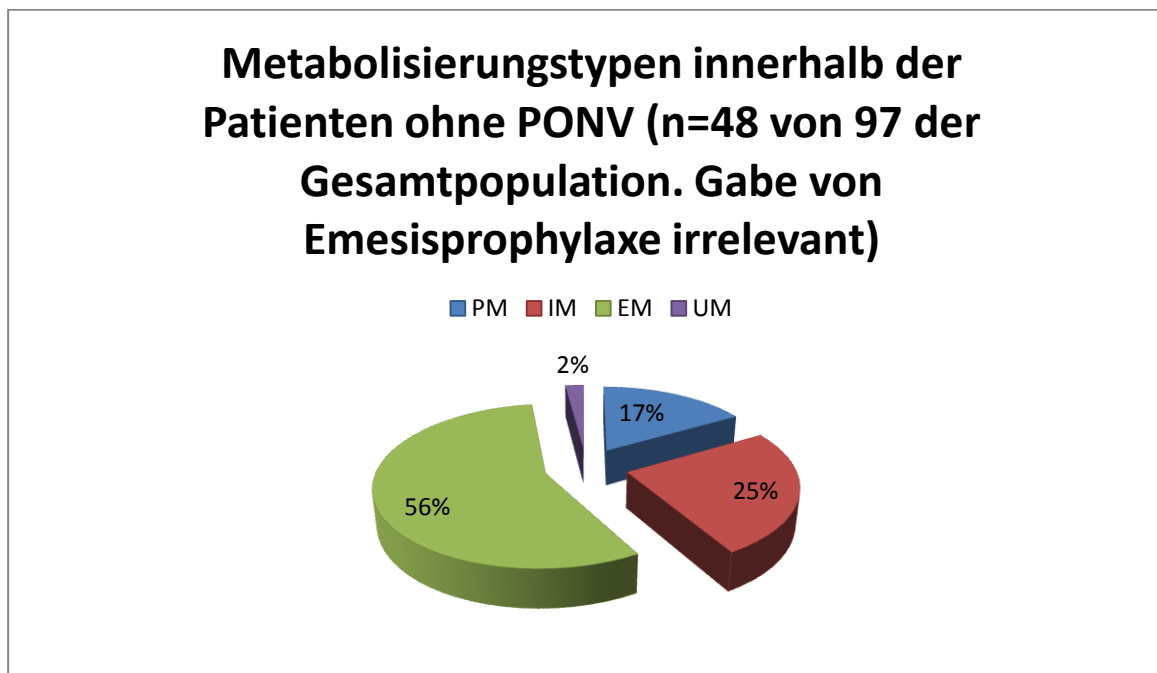


Abb.15: Häufigkeitsverteilung der Metabolisierungstypen der 48 Patienten ohne PONV-Auftreten. Bei dieser Betrachtung wurde eine eventuelle Gabe von Emesisprophylaxe vernachlässigt

Der Status des *Extensive Metabolizers* (EM) fand sich bei diesen 48 Patienten mit 56% am häufigsten. Am zweithäufigsten fand sich der *Intermediate Metabolizer* (IM) mit 25%-igem



### 3. Ergebnisse

Vorkommen. Ein defizientes CYP2D6-Enzym wurde in 17 % der Fälle in Form des *Poor Metabolizers* (PM) nachgewiesen. Am seltensten trat der *Ultrarapid Metabolizer* (UM) in 2% der Fälle auf.

In Abb. 16 wird die Verteilung der Metabolisierungstypen innerhalb der 49 Patienten visualisiert, welche ein aktuelles PONV-Ereignis hatten.

Der EM-Status fand sich bei diesen 49 Patienten mit 40% am häufigsten. Am zweithäufigsten kam der IM-Status mit 33% vor. Ein defizientes CYP2D6-Enzym wurde in 23 % der Fälle in Form des PM-Status nachgewiesen. Am seltensten trat der UM-Status mit 4% der Fälle auf.

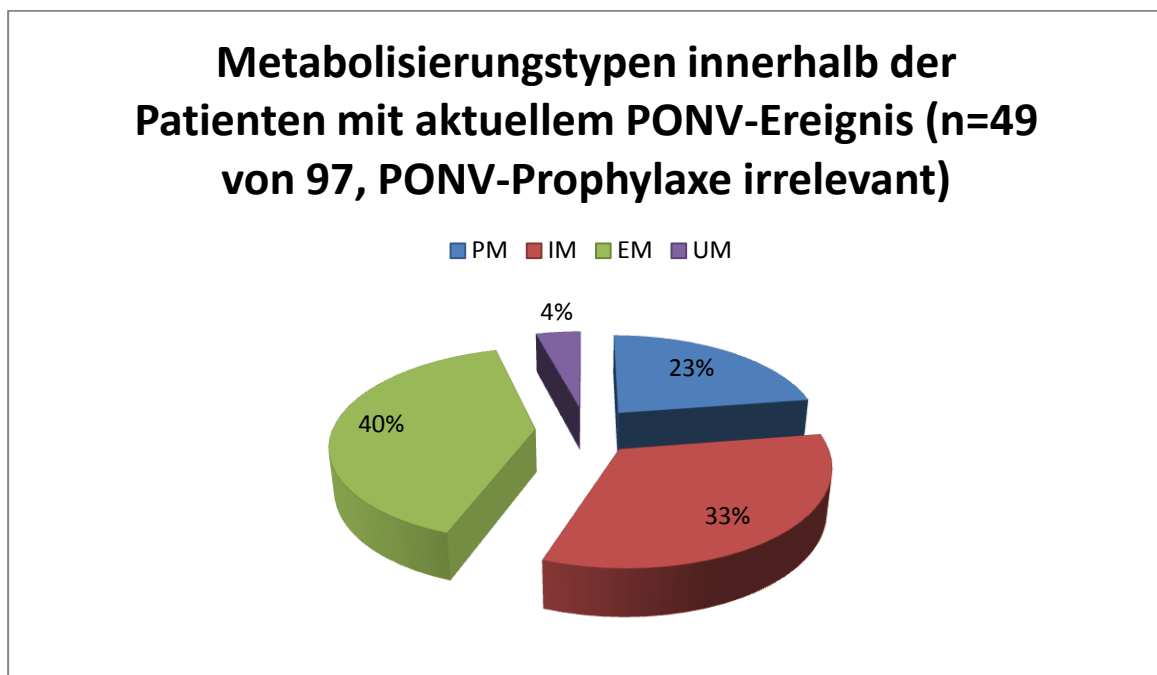


Abb. 16: Häufigkeitsverteilung der bestimmten Metabolisierungstypen innerhalb der 49 Patienten, welche unabhängig einer PONV-Prophylaxegabe postoperativ erbrochen haben

In Tabelle 3.13 wird die Verteilung der Metabolisierungstypen von den 48 Patienten ohne PONV und den 49 Patienten mit PONV mit Geschlechterverteilung und Angaben der Häufigkeiten aufgeführt.

### 3. Ergebnisse

Kein PONV (n=48)					PONV (n=49)					Vergleich Signifikanz
Metabol.	Frau	Mann	ges.	Häufigk. % von n=48	Metabol.	Frau	Mann	ges.	Häufigk. % von n=49	p-Wert
PM	5	3	8	16,64	PM	6	5	11	22,44	0,501
IM	11	1	12	24,96	IM	11	5	16	32,64	
EM	21	6	27	56,16	EM	14	6	20	40,08	
UM	1	0	1	2,08	UM	2	0	2	4,16	
GESAMT	38	10	48			33	16	49		
Häufigkeit in % von n=48	79,04	20,08				68,64	33,28			
Frauen: p=0,711, Männer: p=0,395										

Tabelle 3.13: Auftreten von PONV und Metabolisierungstypen innerhalb der Gesamtpopulation (n=97); hierbei haben sich die Metabolisierungstypen nicht signifikant auf das PONV-Auftreten ausgewirkt (p=0,501), ebenfalls bei der geschlechtsbezogenen Betrachtung ließ sich keine Signifikanz im PONV-Auftreten in Bezug auf die verschiedenen Metabolisierungstypen nachweisen (Frauen: p=0,711; Männer: p=0,395; Fisher's Exakter Test)

Die Unterschiede im Auftreten von PONV in Betrachtung des Geschlechts und der Metabolisierungstypen waren nicht signifikant (p=0,501).

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.3.2. Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale zwischen dem Auftreten von PONV und dem Nichtauftreten von PONV unabhängig einer Emesisprophylaxegebe im gesamten Patientengut

In Tabelle 3.14 werden die allgemeinen Gruppenmerkmale der Patienten mit und ohne PONV-Ereignis gegenübergestellt.

Gruppenmerkmal	Kein PONV (n=48)	PONV (n=49)	p-Wert
Altersmedian in Jahren	52,5 (16-78J.)	63 (22-85J.)	0,063
Geschlecht	38 Frauen, 10 Männer	33 Frauen, 16 Männer	0,252
BMI in kg/m <sup>2</sup>	26,51 (16,76-40,37)	25,5 (19,8-36,1)	0,639
Art der OP	Abdomen: 15 Trauma: 17 Hals+Kopf: 6 Retroperitoneum: 2 Haut: 1 Neuro: 0 Thorax: 2 Sonstige: 5	Abdomen: 15 Trauma: 11 Hals+Kopf: 12 Retroperitoneum: 4 Haut: 2 Neuro: 2 Thorax: 0 Sonstige: 3	0,271
Raucher	8	6	0,576
poNV in Anamnese	44	25	p < 0,001
Postoperative Opioidgabe	29	24	0,310

Tabelle 3.14: Unterschiede allgemeiner Gruppenmerkmale zwischen Patienten ohne Auftreten von PONV (n=48) und Patienten mit Auftreten von PONV (n=49) unabhängig einer Emesisprophylaxegebe; die p-Werte beziehen sich darauf, ob das Vorhandensein eines Gruppenmerkmals zu PONV prädisponiert, hierbei war das Vorhandensein einer PONV-Anamnese signifikant für die geringere PONV-Inzidenz (p<0,001; Chi-Quadrat Test, Exakt berechnet; für den Vergleich von Alter und BMI wurde jeweils der Mann-Whitney-U-Test, Exakt berechnet, verwendet).

Alter, Geschlecht, BMI, Art der Operation, Raucherstatus und postoperative Opioidgabe lagen allesamt im Zufallsbereich (p-Werte s. Tab. 3.14).

Von 97 Probanden hatten 44 eine positive PONV-Anamnese. Der Bezug zum Auftreten von PONV ist hochsignifikant mit einem p-Wert von <0,001. In der vorliegenden Analyse prädisponierte demnach eine positive PONV-Anamnese für das Nicht-Auftreten von PONV.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4. Analyse möglicher Prädiktoren für PONV

Nach der Durchführung einer logistischen Regression konnten in der untersuchten Population folgende unabhängige Prädiktoren für das Auftreten, bzw. Nicht-Auftreten von PONV ermittelt werden:

- 1) Nach einseitigem Kendall-Tau korrelierte mit PONV: das Vorhandensein einer PONV-Prophylaxe ( $p=0,003$ ), das Alter ( $p=0,03$ ), PONV-Anamnese ( $p<0,0001$ ), Vorhandensein der Mutation 31G>A, welche zum EM-Allel \*35 führt ( $p=0,03$ ), die Frameshift zum CYP2D7-Gen im Exon 1 ( $p=0,044$ ) und die Mutation 2483G>T, welche zum PM-Allel \*15 führt ( $p=0,022$ ).
- 2) In der nachgeschalteten binären logistischen Regression wurden die unter 1) genannten Variablen geprüft (außer 2483G>T, da ihre Häufigkeit unter 6 Ereignissen lag). Die Auswertung mit Angabe der Konfidenzintervalle (CI) ist in Tab. 3.15 aufgeführt.

Faktor	OR	95%-iges Konfidenzintervall von -bis	Sign. (p)
PONV-Anamnese	0,08	0,026 - 0,219 0,026 - 1,04 1,321 - 66,47	$p<0,001$
Val1metg	0,164		$p=0,055$
Framesh	9,372		$p=0,025$

Tab. 3.15: Ergebnisse der binär logistischen Regression und zugehörige Konfidenzintervalle („Frameshift“ steht für PM-Allel \*15, Val1Met =der Aminosäureaustausch durch die Mutation 31G>A, welche zum EM-Allel \*35 führt); OR=Odds Ratio, CI=Konfidenzintervall, Sign.=Signifikanz

Weiterhin ergab sich eine positive Kreuzkorrelation von PONV-Prophylaxe und PONV-Anamnese. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Patienten mit PONV-Anamnese in der vorliegenden Studie mehr mit PONV-Prophylaxe versorgt wurden.

Andererseits ergab sich eine negative Kreuzkorrelation zwischen einer durchgeführten PONV-Prophylaxe und dem Auftreten von PONV. Folglich wurde durch eine eingesetzte Prophylaxe PONV nicht zwingend reduziert.

- 3) Im nächsten Schritt wurde eine Korrelationsanalyse von den Faktoren 31G>A (Allel \*35), Frameshift (Allel \*33) und erhobene PONV-Risikofaktoren nach Apfel et al., 1999 (s.a. Kap. 1.2.4.). Hierbei ergaben sich ebenfalls die o.g. PONV-Prädiktoren.

### 3. Ergebnisse

---

- 4) In der binär logistischen Regression, mit der abhängigen Variable PONV und den untersuchten Variablen ergaben sich folgende signifikante Korrelationen aus Pearson einseitig und den sog. Apfel-Faktoren (s.a. Kap. 1.2.4.): Es korrelierten die PONV-Risikofaktoren nach Apfel et al. [1999], mit dem Vorhandensein des EM-Allels \*35 und des PM-Allels \*33.

Zusammenfassend war festzustellen, dass eine PONV-Anamnese und das Vorhandensein des Allels \*35 das PONV-Risiko senkten und das Vorhandensein des Allels \*15 das PONV-Risiko steigerte.

## 4. Diskussion

---

### 4. Diskussion

Ohne Prophylaxe liegt die Inzidenz von PONV bei 20-80 % und ist damit eine der häufigsten Komplikationen bei Allgemeinanästhesien. In Deutschland betrifft das jährlich bis zu 2,4 Mio Patienten, die ohne spezifische Prophylaxe an PONV leiden [Böhm et al., 2008].

Neben den zum Teil schwerwiegenden Folgen für den Patienten, wie z.B. Nahtdehiszenzen und Aspirationspneumonien, sind auch ökonomische Aspekte nicht außer Acht zu lassen. Eine PONV-Prophylaxe beim Risikopatienten ist kosteneffektiv [Watcha et al., 2000], denn PONV führt unter anderem zur signifikanten Verlängerung der Verweildauer im Aufwachraum. Dadurch entstehen höhere Kosten im personellen Betreuungsaufwand [Edler et al., 2007].

Zur etablierten Emesisprophylaxe zählen u.a. 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptorantagonisten (z.B. Ondansetron), zu deren Verstoffwechselung das hochpolymorphe CYP2D6-Protein benötigt wird. Im Falle von Genkopien des CYP2D6, die zu einer ultraschnellen Metabolisierungskapazität führen, wird Ondansetron zu schnell verstoffwechselt. Dies kann eine erhöhte PONV-Inzidenz trotz verabreichter Emesisprophylaxe zur Folge haben [Candiotti et al., 2005].

Ursächlich für die verschiedene Metabolisierungskapazität sind die Proteinfunktion beeinflussende Mutationen. Es werden derzeit 80 verschiedene Allele aufgrund verschiedener SNP's (single nucleotide polymorphisms) in der offiziellen Allelnomenklatur determiniert (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Weitere neu entdeckte SNP's sind bereits bekannt, aber noch nicht der Allelnomenklatur näher zugeordnet.

Es werden folgende CYP2D6-Metabolisierungstypen unterschieden: der *Poor Metabolizer* aufgrund einer fehlenden Enzymfunktion, der *Extensive Metabolizer* mit schneller Katalysierungsaktivität, der *Intermediate Metabolizer* mit eingeschränkter Enzymfunktion und der *Ultrarapid Metabolizer* mit entsprechend schneller Enzymfunktion aufgrund von Genduplikationen.

Bei letzterem wirkt aufgrund einer ultraschnellen Enzymaktivität ein betreffendes Medikament nicht effizient genug, da es zu rasch verstoffwechselt wird. Eine höhere Dosierung des Medikamentes wäre folglich zum Erreichen adäquater Wirkspiegel erforderlich. Dagegen können im Falle eines defizienten Enzymstatus Überdosierungen mit zum Teil lebensbedrohlichen unerwünschten Nebenwirkungen resultieren. Neben den HT<sub>3</sub> - Rezeptorantagonisten sind Antidepressiva, Antiarrhythmika der Klasse 1, Betablocker,

## 4. Diskussion

---

Neuroleptika, Amphetamine und Opiode weitere Derivate des CYP2D6-Systems [Eichelbaum et al., 1990; Zanger et al. 2001].

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine empirische Analyse vorliegender Varianten im CYP2D6-Gen von PONV-Patienten. Neben der Suche nach noch unbekannten Polymorphismen sollte eine Genotypisierung hinsichtlich des CYP2D6-Status erfolgen. Durch den Rückschluss auf den Phänotyp über die Genotypisierung sollte ein Zusammenhang der gegebenenfalls verabreichten PONV-Prophylaxe zum PONV-Auftreten hergestellt werden.

Bekannte Verfahren zur CYP2D6-Mutationsanalyse existieren mit unterschiedlichen Ansätzen. Meist wurde eine gezielte Alleldeterminierung mit Hilfe von allelspezifischen PCR-Assays angewandt. Das \*5-Allel wurde beispielsweise früher anhand einer RFLP-Analyse detektiert. Diese Methode war zeitaufwendig, kostenintensiv und erforderte große Mengen an qualitativ hochwertiger DNA.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Pilotstudie eine Komplettssequenzierung aller Exons und Introns des CYP2D6 mit angrenzender jeweiliger untranslatierter Region des 5'- und des 3'-Endes des CYP2D6 durchgeführt. Diese Form der Genotypisierung ist zwar aufwändig, aber ermöglicht die Einbeziehung der Introns sowie der Exon/Intron Grenzen. Die gängigen allelspezifischen PCR-Assays liefern zumeist keine Informationen über diese Regionen. Eine dortige genetische Variation kann jedoch das mRNA-Splicing und die Translation beeinflussen und somit ebenfalls für eine CYP2D6-Dysfunktion ursächlich sein. Für die Kaukasier relevante Beispiele sind die Allele \*3 und \*5. Sie weisen aufgrund einer Intronmutation Nullaktivität auf. Die Allele \*4 und \*41 haben aufgrund von Intronmutationen eine reduzierte Enzymfunktion. Zukünftig soll die Intronsequenzierung des CYP2D6 mehr ins Visier der Forschung gerückt werden, um die bis dahin unbekannte genetische Basis interindividueller Unterschiede im CYP2D6-Arzneimittelmetabolismus zu untersuchen [Ingelmann-Sundberg et al., 2010]. Ein weiterer Vorteil der CYP2D6-Komplettssequenzierung besteht in der Möglichkeit, neue SNP's (single nucleotid polymorphisms) zu identifizieren. Ein weiterer Vorteil der Methode liegt darin, dass man relativ wenig DNA benötigt. Zusammenfassend ist die vorliegende Methode als eine solide Basis einer umfassenden Mutationsanalyse zu sehen, die anhand einer größeren Patientenzahl validiert werden sollte.

## 4. Diskussion

---

Die Untersuchungen auf Deletion und Duplikation wurden nach bewährten Verfahren jeweils nach Lovlie et al. [1996] bzw. Steen et al. [1995a] durchgeführt (s.a. Kap. 2.4.4. u. 2.4.5., S. 23ff.).

Es konnten bei den 97 eingeschlossenen Probanden 23 Polymorphismen detektiert werden. Hierbei konnte aufgrund der verwendeten Methode zwischen Homo- und Heterozygotie unterschieden werden. Im Vergleich zu Referenzarbeiten [z.B. Marez et al., 1997] sind die Häufigkeiten der determinierten Polymorphismen dieser vorliegenden Arbeit repräsentativ gegenüber der bisher verbreiteten Zahlen für die kaukasische Bevölkerung.

Nach der Zuweisung der 23 detektierten Polymorphismen der eingeschlossenen 97 Probanden konnten letztlich 22 Allele identifiziert werden. Insgesamt ließen sich aus den 194 Allelen 42 verschiedene Genotypen festlegen.

Sachse et al. [1997] schlugen vor, dass aufgrund der Häufigkeiten unter den Kaukasiern die Bestimmung der CYP2D6-Allele -\*3-\*6, sowie der Duplikationsbestimmung, ausreiche. Fuselli et al. [2004] erweiterten diese Empfehlung auf die Allele -\*1-\*6, -\*9, -\*10 und -\*17. Hätte man dieses Vorgehen am Patientengut dieser Arbeit angewandt, so wären ca. 71% der bestimmten Allele richtig bestimmt worden. Die übrigen Probanden, welche immerhin ein knappes Drittel der Probandenpopulation ausmachen, wären nicht hinreichend bestimmt worden. Betrachtet man für diesen Teil der Studienpopulation die aus den Genotypen abgeleiteten Phänotypen, so wären 12 Ergebnisse besonders relevant. Denn für 6 der Teilnehmer wäre eine reduzierte Enzymfunktion (IM-Status) und für ebenfalls 6 Teilnehmer eine fehlende Enzymfunktion (PM-Status) nicht detektiert worden. Insofern schien der diagnostische Ansatz des vorliegenden umfangreichen Mutationsscreenings gerechtfertigt.

Andererseits wäre zu überlegen, ob ausgehend von einer Kosten-Nutzen Analyse eher das vielleicht schnellere und kostengünstigere Verfahren nach Sachse et al. [1997] und Fusselli et al. [2004] zu wählen sei, welches etwa 88% der Patienten richtig klassifizieren soll. Im Falle persistierender Therapienebenwirkungen könnte im Anschluss bei den betreffenden Patienten die aufwändigere und detailliertere Genotypisierung, wie in der vorliegenden Arbeit praktiziert, erfolgen.

Im Anschluss an die Genotypisierung wurde mithilfe eines vereinfachten Punkte-Systems der Phänotyp unter Einbeziehung veröffentlichter Erkenntnisse der betreffenden Mutationskonsequenzen hergeleitet. Aufgrund zahlreicher bisher veröffentlichter MR-



## 4. Diskussion

---

Analysen bei bestimmten Genotypen liegen mittlerweile ausreichend Informationen zur direkten Bestimmung des Phänotyps aus dem Genotyp vor. Beispielsweise ist nach der genetischen Analyse eines Wildtypes die normal schnelle Enzymaktivität im Sinne des EM-Status anzunehmen, ohne zusätzlich eine kosten- und zeitaufwendige MR-Bestimmung durchführen zu müssen. Das beschriebene Vorgehen wurde aus validierten Verfahren, zum Beispiel das *Activity-Score-System* von Gaedigk et al. [2008] oder auch die weiterführende Berechnung der sog. semiquantitativen Gendosis durch Steimer et al. [2004] abgeleitet. Lediglich die Einstufung zum *Intermediate Metabolizer* war komplexer, da in der Literatur kontroverse Angaben zu finden sind, wie zum Beispiel die Allelkonstellation CYP2D6\*2/\*4. In dieser Arbeit wäre mittels Punkte-Systems ein Wert von 1 und damit eindeutig das Vorhandensein des IM-Status ermittelt worden. Toscano et al. [2006] publizierten, dass bei der Allelkombination \*2/\*4 des CYP2D6 mittels MR-Bestimmung sowohl ein EM-, IM- und sogar PM-Status bestimmt wurde. Weiterhin zeigten Furmann et al. [2004] dass ein Patient mit der genotypischen Konstellation IM/IM keinen Unterschied bezüglich der Plasmakonzentration von Desipramin zu den EM/IM- oder den EM/PM-Patienten hatte. Ein letztes Beispiel zur Verdeutlichung der komplexen Thematik bezüglich der Zuweisung zum IM-Phänotyp findet sich in der Arbeit von Marez et al. [1997]. Dort wurde mittels MR-Bestimmung bei drei Individuen trotz des Vorhandenseins eines genotypisch aktiven Allels der PM-Status anstelle des IM-Status ermittelt. Gründe für diese Diskrepanzen können außer den o.g. äußeren Einflüssen ebenfalls andere genetische Faktoren außerhalb des CYP2D6-Gens sein, die zu einer variablen Genexpressivität oder veränderter Enzymaktivität führen. Es ist theoretisch möglich, dass aufgrund des o.g. vereinfachten Punktesystems eine falsch hohe oder aber falsch niedrige Zahl an IM-Phänotypen im Probandengut vorlagen. Sollte das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur anderweitigen Anwendung kommen, wäre bei therapieresistenten Fällen eine zusätzliche MR-Bestimmung im Falle des Vorhandenseins des IM-Phänotyps abzuwägen.

Unter den 97 Probanden wurden in etwa 47% der Fälle EM's, in 30% IM's, in 20% PM's und in etwa 3% UM's bestimmt. Die Frage einer beobachteten Häufung des PONV-Auftretens in Bezug auf den ermittelten Phänotyp soll im Folgenden geklärt werden.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Metabolisierungstypen in der Gesamtpopulation gezielt nach dem Kriterium des stattgehabten PONV-Ereignisses, so gewinnt man den Eindruck, dass eher Patienten mit dem UM- und IM-Status postoperativ erbrachen. Die diesbezügliche statistische Berechnung im Fischer's-Test ergab jedoch keine Signifikanz des PONV-Auftretens

## 4. Diskussion

---

bei Vorhandensein eines speziellen Metabolisierungstypes. Die gleiche Überlegung mit der zusätzlichen Frage nach geschlechtsbezogenem häufigerem Erbrechen der einzelnen Metabolisierungstypen ergab statistisch ebenfalls keine Signifikanz.

Auch bei Teilung der 97 Teilnehmer nach dem Kriterium einer verabreichten PONV-Prophylaxemedikation in 2 Gruppen, Gruppe 0 ohne Medikation, Gruppe 1 mit Medikation, ergab sich keine Signifikanz im PONV-Auftreten.

Prüft man die gängigen PONV-Risikofaktoren in den beiden Gruppen, findet sich in Bezug auf die Geschlechterverteilung, BMI, postoperative Opioidgabe, Art des Eingriffs und den Nichtraucherstatus keine signifikante Prädisposition, PONV zu entwickeln. Betreffs des Alters differierten die Gruppen. Während sich in der Gruppe 0 das altersbezogene Vorkommen von PONV zufällig ereignete, waren die vergleichbaren Probanden in Gruppe 1 signifikant älter ( $p=0,027$ ) als die Patienten ohne aktuelles PONV-Ereignis. In Bezug auf den Risikofaktor einer positiven PONV-Anamnese mit hoch eingestufte Prädisposition nach Apfel et al. (2004) zeigte sich mit den erhobenen Daten aus Gruppe 0 keine bestätigende Auswirkung beim Auftreten von PONV.

Die statistische Analyse der gesamten Studienpopulation ergab, dass bei vorhandener positiver PONV-Anamnese hochsignifikant weniger Studienteilnehmer ein aktuelles PONV-Ereignis entwickelten ( $p<0,001$ ). Dieses Ergebnis war unerwartet. Eine mögliche Erklärung könnte ein Ausnahmephänomen des hiesigen Probandengutes sein. Ebenso wären andere Ursachen, wie Umwelteinflüsse, unbekannte genetische Konstellationen oder auch Interaktionen denkbar.

Nach der Analyse der im Probandengut zu PONV prädisponierenden Risikofaktoren wurden im Nachgang unabhängige PONV-Prädiktoren mittels logistischer Regressionsanalyse herausgearbeitet. Die PONV-Prophylaxe zählt dabei zu den ermittelten PONV-Prädiktoren insofern, dass in der Probandenpopulation Patienten mit einem stattgehabten PONV-Ereignis in der Anamnese signifikant mehr mit einer PONV-Prophylaxe versorgt wurden. Die statistische Analyse ergab allerdings auch, dass in der betreffenden Population der Einsatz einer PONV-Prophylaxe das Auftreten von PONV nicht zwingend reduzierte. Hierfür könnte der Enzymaktivitätsstatus des CYP2D6 verantwortlich sein. In der Subgruppenanalyse wurde jedoch sowohl in der Gruppe mit PONV-Prophylaxe, als auch in der Gruppe ohne PONV-Prophylaxe kein signifikanter Unterschied bezüglich der gegenübergestellten Phänotypen (d.h. der Enzymaktivitäten) und dem Auftreten von PONV bestimmt. Eventuell könnte eine

## 4. Diskussion

---

ungeeignete Emesisprophylaxe-Dosis für den jeweiligen Phänotyp vorliegen, welcher zum Zeitpunkt der Emesisprophylaxegabe nicht bekannt war. Jedoch zeigte sich auch bei den EM's und IM's, welche von einer Standarddosis profitieren müssten, dass ein PONV-Ereignis trotz PONV-Prophylaxe eintrat. Fest steht, dass die Gabe einer PONV-Prophylaxe keine Garantie für die Vermeidung von PONV ist. Rüsch et al. [2010] verfassten aktuell einen umfassenden Überblick über die PONV-Problematik. Daraus war zu entnehmen, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen Dexamethason und Ondansetron eine relative Reduktion des PONV-Risikos von etwa 26% erzielt wurde. Weiterhin sollte bedacht werden, dass die Pathophysiologie von PONV nicht abschließend geklärt ist und die PONV-Entstehung letztlich auch äußeren Einflüssen unterliegt. Zusätzlich wurde im Patientengut durchweg eine Allgemeinanästhesie durchgeführt. Eventuell wären einige PONV-Ereignisse durch eine Totalintravenöse-Anästhesie (TIVA) in Kombination zur Emesisprophylaxe vermeidbar gewesen.

Ein weiterer PONV-Prädiktor stellt das Vorhandensein des CYP2D6-Allels \*35 dar, welches zum EM-Status führt. Hatte ein Proband dieses Allel, so ereignete sich tendenziell seltener PONV. In der Literatur findet sich keine vergleichbare Beobachtung. Insgesamt trugen in der vorliegenden Arbeit fünf Teilnehmer ein Allel \*35. Davon waren drei *Extensive Metabolizer*, einer *Intermediate Metabolizer* und einer *Ultrarapid Metabolizer*. Speziell im Falle des einen Allel-\*35 tragenden UM überrascht die ermittelte tendenzielle PONV-Prädiktion, da aufgrund der schnellen Stoffwechsellage eine höhere Dosierung der Emesisprophylaxe erforderlich wäre. Gegebenenfalls wirkten bei den betreffenden Patienten, welche über das Allel \*35 verfügten und bei denen kein PONV-Ereignis eintrat, andere Faktoren mit. Beispielsweise unbekannte zusätzliche genetische Dispositionen anderer Enzyme, wie etwa dem CYP3A4, welche zum Teil ebenfalls an der Metabolisierung der 5HT<sub>3A</sub>-Antagonisten beteiligt sind. Bei der Betrachtung der üblichen PONV-Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, Art der OP, postoperative Opioidgabe, Nichtraucherstatus) ergab sich für die \*35-tragenden Studienteilnehmer kein vermindertes PONV-Risiko gegenüber anderen Teilnehmern mit normaler Enzymfunktion.

Der dritte eruierte PONV-Prädiktor der hiesigen Studienpopulation stellt das Vorhandensein des CYP2D6-Allels \*15 dar. Im Gegensatz zu den beiden o.g. PONV-Prädiktoren steigert dieser das PONV-Risiko. Das Allel \*15 führt aufgrund seiner Mutation zum CYP2D6-Enzymstatus des *Poor Metabolizers*. Im hiesigen Patientengut trugen zwei das CYP2D6\*15-Allel. Bei einem Probanden führte die Kombination des PM-Allels \*15 mit dem duplizierten EM-Allel \*2 letztlich

## 4. Diskussion

---

zu normal schneller Enzymaktivität. Hier müsste die applizierte Emesisprophylaxe Wirkung zeigen. Dennoch könnten Umwelteinflüsse, die Häufung von PONV-Risikofaktoren und zuletzt mögliche unbekannte Interaktionen für das Eintreten des PONV-Ereignisses vorausbestimmend sein. Im zweiten Fall führte die Kombination des Allels \*15 mit dem Allel\*4, ebenfalls ein PM-Allel, zum phänotypischen *Poor Metabolizer*. Dadurch könnte die PONV-Inzidenz steigen.

Schwerpunkt dieser vorliegenden Arbeit war die genetische Analytik zur Komplettssequenzierung des CYP2D6 als Versuch einer Gen-Assoziationsstudie, bei welcher die Komplexität der PONV-Problematik zum Ausdruck kam. Es konnten unabhängige Variable für das Auftreten und Nichtauftreten von PONV identifiziert werden. Allerdings mit der Einschränkung, dass eine genauere Differenzierung zwischen Patienten mit und ohne aktuellen PONV-Ereignisses wünschenswert und notwendig gewesen wäre. In die komplexe Suche gingen zu viele Variable mit ein, wofür die Fallzahl zu klein war. Die vorliegende Pilotstudie sollte in späteren Studien hinreichend evaluiert werden. Hierbei sollten die beteiligten Variablen im Vorfeld genauer herausgearbeitet werden. Insbesondere scheint die genaue Definition sog. „PONV-Patienten“ (d.h. des Phänotyps) von essentieller Relevanz in einer diesbezüglichen Gen-Assoziationsstudie zu sein. Mit der vorgestellten Studie konnte jedoch ein wichtiger methodischer Beitrag zur weiteren Aufklärung pharmakogenetischer Beziehungen um das CYP2D6-Enzym geleistet werden.

## 5. Zusammenfassung

---

### 5. Zusammenfassung

Postoperative Übelkeit und Erbrechen (*postoperative nausea and vomiting*, Kurz: PONV) treten als häufigste Nebenwirkung der Allgemeinanästhesie auf und werden von den betroffenen Patienten als besonders negative Folge einer Narkose empfunden. Die Inzidenz von PONV schwankt zwischen 20-80% und kann bei Hochrisikogruppen bis zu 80% betragen. Durch den Einsatz von Prophylaxemedikation konnte das Auftreten der Erkrankung gesenkt werden.

Das CYP2D6-Protein ist ein Enzym aus dem Cytochrom P 450 System. Dieses beinhaltet eine Reihe verschiedener Hämoproteine, die an der Zellatmung als Redoxkatalysatoren fungieren. Insbesondere im Rahmen der Arzneimittelverstoffwechselung nimmt das CYP2D6 seine Hauptfunktion ein. Unter anderem verstoffwechselt es die zur Emesisprophylaxe eingesetzten 5HT<sub>3-A</sub>-Antagonisten (z.B. Ondansetron). Ein bedeutender Enzyminduktor ist Dexamethason. In dieser Arbeit wurde den Patienten, im Falle einer verabreichten PONV-Prophylaxe, eine Kombination aus Ondansetron und Dexamethason verabreicht.

Bislang ist der Einfluss von CYP2D6-Allelen auf die perioperative Komplikationsrate in Abhängigkeit von der Medikation wenig untersucht.

Im Fokus dieser experimentellen Arbeit stand die Identifizierung möglicher genetischer Varianten im CYP2D6-Gen. Aus dem Vollblut von 97 Probanden wurde die genomische DNA isoliert, um anschließend spezifische Bereiche des CYP2D6-Gens mittels PCR zu amplifizieren. Zur Identifikation des Allelstatus erfolgte eine komplette Gensequenzierung des CYP2D6. Zusätzlich zur Betrachtung aller aufgefundenen Polymorphismen aus Introns und Exons wurden spezielle PCR-Reaktionen zur Detektion von Duplikationen und Gendeletionen geführt.

Mit Hilfe der offiziellen Allelnomenklatur ([www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm](http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm)) erfolgte die Zuordnung der Genotypen, wonach eine Aussage über die Enzymaktivität getroffen werden konnte.

Bezüglich der Fragestellung der Wirksamkeit einer applizierten Emesisprophylaxe und vor dem Hintergrund der vom Genotyp abgeleiteten individuellen Metabolisierungskapazität, erfolgten statistische Gruppenanalysen nach Auftreten oder Nicht-Auftreten von PONV. Hierbei sollten ergänzende Informationen zur praktischen Anwendung im anästhesiologischen Sektor gewonnen werden.

## 5. Zusammenfassung

---

Die 97 eingeschlossenen Patienten dieser Pilotstudie unterzogen sich einer balancierten Allgemeinanästhesie (Vollnarkose) von jeweils mind. 150 min. Dauer. 71% der Studienteilnehmer waren weiblich. Die Notwendigkeit der Verabreichung einer PONV-Prophylaxe wurde anhand des PONV-Risikoscores nach Apfel et al. [2004] ermittelt. Ab einem Punktwert von  $\geq 2$  wurde eine PONV-Prophylaxe verabreicht. Von den 97 Probanden erhielten 47 eine perioperative PONV-Prophylaxe. Postoperativ trat in 43 Fällen ein PONV-Ereignis ein.

Bei der genetischen Analytik konnten 23 verschiedene CYP2D6-Polymorphismen detektiert werden, welche nachfolgend 22 Allelen zugeordnet wurden. Daraus konnten letztlich 42 verschiedene CYP2D6-Genotypen abgeleitet werden.

Weiterhin wurden 6 Duplikationen festgestellt, von denen 3 den Status des *Ultrarapid Metabolizers* (UM) hatten. Die CYP2D6-Deletion wurde 4-mal festgestellt. Hiervon waren 3 *Poor Metabolizer* (PM) und 1 *Intermediate Metabolizer* (IM).

Nachfolgend wurden die Probanden zwei Untersuchungsgruppen zur Analyse zugeteilt, um die PONV-Inzidenzen mit den Metabolisierungstypen und PONV-Risikofaktoren innerhalb der Studienpopulation zu analysieren. Während in Gruppe 0 alle Probanden keine PONV-Prophylaxe erhalten hatten, wurde den Patienten der Gruppe 1 als Emesisprophylaxe Ondansetron und Dexamethason verabreicht.

Insgesamt war in Gruppe 0 kein signifikanter Unterschied bzgl. der PONV-Inzidenz und der am Metabolisierungstyp ersichtliche CYP2D6-Enzymaktivität zu verzeichnen. Bei der Betrachtung der möglichen PONV-Risikofaktoren konnte kein signifikanter Zusammenhang zum PONV-Auftreten hergestellt werden. Einzig die Variable „PONV in der Anamnese“ wurde als Risikofaktor ermittelt, allerdings in prophylaktischer Hinsicht ( $p=0,007$ ). Das gleiche Ergebnis wurde für die Patienten der Gruppe 1 ermittelt (hier  $p=0,018$ ).

Ein Zusammenhang zur Wirksamkeit der PONV-Prophylaxe und den detektierten CYP2D6-Metabolisierungstypen konnte nicht eruiert werden.

Zuletzt wurde die Gesamtpopulation hinsichtlich der PONV-Inzidenz unter Betrachtung der CYP2D6-Phänotypen beleuchtet. Hierbei wurde die Emesisprophylaxegabe außer Acht gelassen. In gleicher Weise wie bei den Gruppen 0 und 1, war auch hier zunächst kein signifikanter Zusammenhang zu beobachten gewesen. Des Weiteren wurde erneut festgestellt,

## 5. Zusammenfassung

---

dass signifikant weniger Patienten mit PONV in der Anamnese ein aktuelles PONV-Ereignis erlitten.

Im Anschluss erfolgte eine unabhängige, multivariate statistische Analyse zur Ermittlung möglicher PONV-Prädiktoren. Hierbei wurden 2 PONV-Prädiktoren formuliert. Eine positive PONV-Anamnese ließ das PONV-Risiko in der Studienpopulation sinken. Gleiches galt tendenziell auch für das Vorliegen des CYP2D6-Allels\*35. Dagegen steigerte das Vorhandensein des CYP2D6-Allels\*15 das PONV-Risiko signifikant.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der genetischen Analytik des hochpolymorphen CYP2D6-Gens. Im Versuch einer Genassoziationsstudie kam die Komplexität der PONV-Problematik zum Ausdruck, wonach nicht alle potentiellen PONV-Einflussvariablen kalkulierbar waren.

Es konnten unabhängige Variablen im CYP2D6-Gen für das Auftreten und das Nichtauftreten von PONV identifiziert werden. Dabei wirkte einschränkend, dass eine genauere Differenzierung der Patientenvariablen zur effizienteren Datensammlung notwendig gewesen wäre. Für die geringe Fallzahl (n=97) gingen zu viele Variablen in die komplexe Analyse ein. Deshalb sollen die Ergebnisse im Sinne einer Pilotstudie gewertet und später anhand höherer Fallzahlen validiert werden.

# Literaturverzeichnis

---

## Literaturverzeichnis

- 1 Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelmann-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 Alleles. JPET. 1996; 278: 441-446
- 2 Allorge D, Harlow J, Boulet O, Hayhurst GP, Chowdry J, Roth E, Crewe K, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Broly F, Tucker GT, Ellis SW. In-vitro analysis of the contribution of CYP2D6.35 to ultra-rapid metabolism. Pharmacogenetics. 2001 Nov;11(8):739-41
- 3 Andrews PLR: Physiology of nausea and vomiting. Br J Anaesth. 1992; 69: 2S-19S
- 4 Apfel CC, Greim CA, Goepfert C, Grundt D, Usadel J, Sefrin P, Roewer N Postoperatives Erbrechen. Ein Score zur Voraussagung der Erbrechenswahrscheinlichkeit nach Inhalationsanästhesien. Anaesthesist. 1998; 47:732-740
- 5 Apfel CC, Läärä E, Koivuranta M, Greim CA, Roewer M. A simplified risk score for predicting postoperative nausea and vomiting: Conclusions from crossvalidations between two centers. Anesthesiology. 1999; 91:693-700
- 6 Apfel CC, Roewer N. Einflussfaktoren von Übelkeit und Erbrechen nach Narkosen – Fiktion und Fakten. Anaesthesist. 2000; 49:629-642
- 7 Apfel CC, Kranke P, Eberhart L, Roos A, Roewer N. Comparison of predictive models for postoperative nausea and vomiting. Br J Anaesth . 2002; 88: 234-240
- 8 Apfel CC, Roewer, N. Postoperative Übelkeit und Erbrechen. Anaesthesist . 2004; 53:377-391
- 9 Apfel CC. Pathophysiologie, Risikofaktoren und Risikoeinschätzung für Übelkeit und Erbrechen in der postoperativen Phase. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2005; 39: 497-503



# Literaturverzeichnis

---

- 10 Bardenheuer H, Taut F. Inzidenz und Pathophysiologie der postoperativen Übelkeit und Erbrechens. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1997; 32:617-619
- 11 Barker JP, Vafidis GC, Hall GM: Postoperative morbidity following cataract surgery. A comparison of local and general anaesthesia. *Anaesthesia* 1996; 51: 435–437
- 12 Bellville JW. Postanaesthetic nausea and vomiting. *Anesthesiology.* 1961; 22:773-780
- 13 Böhm K. Auszug aus dem Datenreport des Statistischen Bundesamtes. – Gesundheit und soziale Sicherung: Gesundheitszustand der Bevölkerung und Ressourcen der Gesundheitsversorgung. 2008; 237-260
- 14 Bunce KT, Tyers MB. The role of 5HT in postoperative nausea and vomiting. *Br J Anaesth.* 1992; 69:60S-62S
- 15 Camu F, Lauwers MH, Verbessem D. Incidence and aethiology of postoperative nausea and vomiting. *Eur J Anaesth.* 1992; 9:S25-S31
- 16 Candiotti KA, Birnbach DJ, Lubarsky DA, Nhuch F, Kamat A, Koch WH, Nikoloff M, Wu L, Andrews D. The impact of pharmacogenomics on postoperative nausea and vomiting: do CYP2D6 allele copy number and polymorphisms affect the success or failure of ondansetron prophylaxis? *Anesthesiology.* 2005 Mar;102(3):543-9
- 17 Clark RSJ. Nausea and vomiting. *Br J Anaesth.* 1984; 56:19-26
- 18 Cohen MM, Duncan PG, DeBoer DP, Tweed WA. The postoperative interview: assessing risk factors for nausea and vomiting. *Anesth Analg.* 1994; 78:7-16
- 19 Cohen MM, Duncan PG, Pope WDP, Wolkenstein C: A survey of anaesthetics at one teaching hospital (1975–1983). *Can Anaesth Soc J* 1986; 33: 22–31
- 20 Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst GP, Pimprale S, Feigenbaum L, untätiges JR. und Gonzalez FJ. The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol.* 2001; 60:1260 - 1267

# Literaturverzeichnis

---

- 21 Dalén P, Dahl ML, Bernal Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. Clin Pharmacol Ther. 1998 Apr; 63(4):444-52
- 22 Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. Fundam Clin Pharmacol. 2003 Feb; 17(1):27-41
- 23 Denis M, Cuthill S, Wikstrom AC, Poellinger L, Gustafsson JA. Association of the dioxin receptor with the Mr 90, 000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. Biochem Biophys Res Commun 1988 Sep 15; 155(2): 801-7
- 24 Distlerath LM, Guengerich FP. Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Dec; 81(23):7348-52
- 25 Eberhart LHJ, Högel J, Seeling W, Staack AM, Geldner G, Georgieff M. Evaluation of three risk scores to predict postoperative nausea and vomiting. Acta Anaesthesiol Scand. 2000; 44 (4), 480–488
- 26 Edler AA, Mariano ER, Goliano B, Kuan C, Pentcheva K. An analysis of factors influencing postanesthesia recovery after pediatric ambulatory tonsillectomy and adenoidectomy. Anesth Analg. 2007; 104: 784–9
- 27 Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ. Proceedings: N-oxidation of sparteine in man and its interindividual differences. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1975; 287 Suppl:R94
- 28 Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ. Influence of the defective metabolism of sparteine on its pharmacokinetics. Eur J Clin Pharmacol. 1979; 16: 189–194
- 29 Eichelbaum M, Bertilsson L, Säwe J, Zekorn C. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. Clin Pharmacol Ther. 1982 Feb; 31(2):184-6

## Literaturverzeichnis

---

- 30 Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osikowska-Evers BO, Tieves G, Zekorn C, Rittner C. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol.* 1987; 23(4):455-8
- 31 Eichelbaum M, Gross AS. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 1990; 46(3):377-94
- 32 Furman KD, Grimm DR. "Impact of CYP2D6 intermediate metabolizer alleles on single-dose desipramine pharmacokinetics." *Pharmacogenetics.* 2004; 14(5): 279-84
- 33 Frighetto L, Loewen PS, Dolman J, Marra CA. Cost-effectiveness of prophylactic dolasetron or droperidol vs rescue therapy in the prevention of PONV in ambulatory gynecologic surgery. *Can J Anesth.* 1999; 46: 536–543
- 34 Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P, Sistonen J, Sajantila A, Barbujani G. Molecular diversity at the CYP2D6 locus in the Mediterranean region. *European Journal of Human Genetics.* 2004; 12: 916-924
- 35 Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics.* 1999; 9(6):669-82
- 36 Gaedigk A, Ryder DL, Bradford LDA, Leeder JS. CYP2D6 Poor Metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the -1584 G promoter polymorphism. *Clinical Chemistry.* 2003; 49(6): 1008-1011
- 37 Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin Pharm Ther.* 2008; 83: 234-242

## Literaturverzeichnis

---

- 38 Gan TJ. Postoperative nausea and vomiting-can it be eliminated? JAMA. 2002; 287(10): 1233-1236
- 39 Golembiewski J, Chernin E, Chopra T. Prevention and treatment of postoperative nausea and vomiting. Am J Health-Sy Pharm. 2005; Vol. 62, Issue 12: 1247-1260
- 40 Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. Pharmacol Rev. (1988) 40(4):243-88. Review. Erratum in: Pharmacol Rev. 1989 Mar; 41(1):91-2
- 41 Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Evolution, structure, and gene regulation of cytochrome P450. in: Ruckpaul K, Rein H (eds.) Frontiers in biotransformation, vol. 1. Akademie, Berlin. 1989; : 195-243
- 42 Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. Lancet. 1990; 1;336(8714):529-32
- 43 Hines RN. Molecular mechanism controlling CYP 1A gene expression. Frontiers in Biotransformation. 1994; 9: 85-110
- 44 Ingelman-Sundberg M. Duplication, multiduplication, and amplification of genes encoding drug-metabolizing enzymes: evolutionary, toxicological and clinical pharmacological aspects. Drug Metab Rev. 1999; 31: 449-459
- 45 Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25: 193-200
- 46 Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. The Pharmacogenomics Journal. 2005; 5, 6-13
- 47 Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Intronic polymorphisms of cytochromes P450. Hum Genomics. 2010; 1;4(6):402-5

## Literaturverzeichnis

---

- 48            Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherit amplification of an active gene in the cytochrome P450 2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of Debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 11825-11829
- 49            Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human Debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989; 45: 889-904
- 50            Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmöller J. Stand der Pharmakogenetik in der klinischen Arzneimitteltherapie. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2006; 49: 995-1003
- 51            Koivuranta M, Läärä E, Snare L, Alahuhta S. A survey of postoperative nausea and vomiting. *Anaesthesia*. 1997; 52:443-449
- 52            Koller C, Jacob W, Hörauf K. Postoperatives Erbrechen – Pathophysiologie, Inzidenz und Prophylaxe. *Anaesth Intensivmed*. 1994; 35:137-143
- 53            Kranke P, Apfel CC, Papenfuss T, Rauch S, Lobmann U, Rubsam B, Greim CA, Roewer N. An increased body mass index is no risk factor for postoperative nausea and vomiting. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001; 45:160-166
- 54            Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*. 1996; 19;392(1):30-4
- 55            Løvlie R, Daly AK, Matre GE, Molven A, Steen VM. Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6\*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics*. 2001; 11(1):45-55
- 56            Macario A, Weinger M, Carney S, Kim BA, Kim A. Which clinical anesthesia outcomes are important to avoid? The perspective of patients. *A & A*. 1999; 89(3): 652-658

## Literaturverzeichnis

---

- 57 Maddali MM, Mathew J, Fahr J, Zarroug AW. Postoperative Nausea and Vomiting in Diagnostic Gynaecological Laparoscopic Procedures: Comparison of the Efficacy of the Combination of Dexamethasone and Metoclopramide with that of Dexamethasone and Ondansetron. *J Postgrad Med.* 2003; 49:302-306
- 58 Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet.* 1977; 17;2(8038):584-6
- 59 Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Lo-Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in an European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 193-202
- 60 Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:269-96
- 61 Miller S.A., Dykes D.D., und Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 3: 1215
- 62 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51 Pt 1:263-73
- 63 Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002; 12;360(9340):1155-62
- 64 Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6(1):1-42
- 65 Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y. (Eds.). *Cytochrome P-450* (2nd edition). Kodansha; Tokyo. 1993
- 66 Palazzo M, Evans R. Logistic regression analysis of fixed patient factors for postoperative sickness: a model for risk assessment. *Br J Anaesth.* 1993; 70:135-140
- 67 Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem.* 1988; 25; 263(27): 13802-5

## Literaturverzeichnis

---

- 68 Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM. Elucidation of the genetic basis of the common intermediate metabolizer phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2000; 10: 577-581
- 69 Rüscher D, Eberhart LHJ, Wallenborn J, Kranke P. Übelkeit und Erbrechen nach Operationen in Allgemeinanästhesie. *Deutsches Ärzteblatt*. 2010; Jg.107, 42: 733-741
- 70 Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997; 60: 284-295
- 71 Schwab M, Marx C, Zanger UM, Eichelbaum M. Pharmakogenetik der Zytochrom-P450-Enzyme. *Deutsches Ärzteblatt*. 2002; Jg. 99, 8: A497-A502
- 72 Steen VM, Molven A, Aarskoy NK, Gulbrandsen AK. Homologous unequal cross-over involving a 2,8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of the human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Human Molecular Genetics*. 1995; 4 (12): 2251-2257
- 73 Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*. 1995a; 5 (4) : 215-23
- 74 Steijns LSW, Van der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin. Chem*. 1998; 44:5 , 914-917
- 75 Steimer W, Zöpf K, von Amelnunx S et al.. Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem*. 2004; 50 (9) :1623-33
- 76 Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ, Leydon VR, Oxbrow AK, Lewis CJ, Tennant MG, Modi S, Eggleston DS, Chenery RJ, Bridges AM. Crystal Structure Of Human Cytochrome P450 2d6. *Biol. Chem*. 2005; 281: 7614-7622
- 77 Serhen H, Toth E, Lajtha A, Vizi ES. Nicotine effects on presynaptic receptor interactions. *Ann New York Acad Sci*. 1995; 757:238-244

# Literaturverzeichnis

---

- 78 Sinclair DR, Chung F, Mezei G. Can postoperative nausea and vomiting be predicted? *Anesthesiology*. 1999; 91: 109-18
- 79 Sweeney BP. Why does smoking protect against PONV? *Br J Anaesth*. 2002; 89: 810-813
- 80 Takeda N, Morita M, Hasegawa S, Horii A, Kubo T, Matsunaga T . Neuropharmacology of motion sickness and emesis. *Acta Otolaryngol*. 1993; 501: 10S-15S
- 81 Toner CC, Broomhead CJ, Littlejohn IH, et al.: Prediction of postoperative nausea and vomiting using a logistic regression model. *Br J Anaesth*. 1996; 76: 347–51
- 82 Toscano C, Klein K, Blievernicht J, Schaeffler E, Sanssele T, Raimundo S, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the \*41 allele caused by the intronic SNP 2988 G>A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2006; 16: 755-766
- 83 Tramer MR, Moore A, McQuay H. Meta-analytic comparison of prophylactic antiemetic efficacy for postoperative nausea and vomiting: propofol anaesthesia vs. omitting nitrous oxide vs. total i.v. anaesthesia with propofol. *Br J Anaesth*. 1997; 78: 256-259
- 84 Vandell P. Antidepressant drugs in the elderly--role of the cytochrome P450 2D6. *World J Biol Psychiatry*. 2003; 4(2): 74-80
- 85 Vögtli A., Ernst B. *Moderne Pharmakokinetik. Transport durch Membranen*. Weinheim: Wiley-VCH. 2010
- 86 Vogel F: *Moderne Probleme der Humangenetik*. *Ergebn Inn Med Kinderheilk*. 1959; 12: 52–125
- 87 Watcha MF. The cost-effective management of postoperative nausea and vomiting. *Anesthesiology*. 2000; 92: 931-933
- 88 Waxman DJ, Azaroff L.. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J*. 1992; 1; 281 ( Pt 3): 577-92



## Literaturverzeichnis

---

- 89 White PF, Sacan O, Nuangchamnon N, Sun T, Eng M. The relationship between patient risk factors and early versus late postoperative emetic symptoms. *International Anesthesia Research Society*. 2008; 107 (2): 459-463
- 90 Whitlock JP Jr. The regulation of cytochrome P-450 gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986; 26: 333-69
- 91 Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stüven T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2001; 11 (7): 573-85
- 92 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Arch Pharmacol*. 2004; 369 (1): 23-37

# Anhang

---

## *Anhang*

### **Primerherstellung**

Primer für PCR „gesamtes CYP2D6“, Primer für Duplikation und Deletion:

- 80µl Wasser
- +10µl vorwärts-Primer
- +10µl rückwärts-Primer

Sequenzierprimer:

- 10µl Primer
- +120µl Wasser

### **Herstellung dNTP's**

- Je 20 µl Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin
- + 920µl Wasser

### **Herstellung des Ladders**

- 20µl Ladder-Konzentrat
- +20µl 10xBBS
- +160µl Wasser

### **Herstellung von 10xBromphenolblau**

- 2,5mg Bromphenolblau
- +4g Saccharose
- +10ml Wasser

### **Herstellung von 0,5 M EDTA**

- 93,05g EDTA (M=372,24)
- +400ml Wasser
- +6g NaOH
- Vorsichtig erwärmen und rühren
- pH auf 8,0

### **Herstellung von 10x-TE-Puffer**

- 1,21g Tris-Puffer (=100mmol/l)
- +372mg EDTA (=10mmol/l)

## Anhang

---

- +80ml Wasser
- Mit HCL pH von 7,5 einstellen
- Gebrauchslösung 1xTE-Puffer steril filtrieren

### Herstellung von 10x-TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer)

- 108g Tris-Base
- +55g Borsäure
- +40ml 0,5M EDTA
- auf 1000ml auffüllen
- filtrieren

### Herstellung des Agarosegels (1%)

Für die Herstellung eines 1%-igen Agarosegels verwendet man 0,6g Agarose-Pulver. Darauf werden 60ml TPE-Puffer gegossen. Nach gründlichem Vermischen erfolgt das Erhitzen in der Mikrowelle. Nach 2-minütigem Kochvorgang wird das Gel auf dem Magnetrührer vorsichtig abgekühlt. Hierbei liegt besondere Beachtung bei der Vermeidung von Luftblasenbildung. Nach dem Abkühlen wird Ethidiumbromid zur Anfärbung hinzugegeben und vermischt. Nach dem Ausgießen auf den Träger erfolgt das Stecken der Kämme in gewünschter Größe und Abstand. Zur Aushärtung werden etwa 30 min benötigt. Danach ist das Gel sofort einsatzbereit.

### Primer P100/200 und Sequenzierprimer

Basiert auf bestehender Genbank-Nummer M 33388. Darstellung des CYP2D6 von der 5'-untranslated region (ab -509) bis zur 3'-untranslated region (bis einschließlich +121).

```
-509 tgtgtgcata gcgctctgtgc atgtcaagag tgcaagggtga agtgaagggga ccaggcccat  
-449 gatgccactc atcatcagga gctctaaggc cccaggtaag tgccagtgc agataaggggt  
-389 gctgaagggtc actctggagt gggcagggtgg gggtagggaa agggcaaggc catgttcttg  
-329 aggaggggtt gtgactacat taggggtgtat gagcctagct gggaggtgga tggccggggtc  
-269 cactgaaacc ctggttatcc cagaaggctt tgcaggcttc aggagcttgg agtggggaga  
-209 gggggtgact tctccgacca ggcccctcca cggcctacc ctgggtaagg gcctggagca
```

P100

```
-149 ggaagcaggg gcaagaacct ctggagcagc ccataccgc cctggcctga ctctgccact  
-89 ggcagcacag tcaacacagc aggttcactc acagcagagg gcaaaggcca
```

tcatcagctc 1F

```
-29 cctttataag ggaaggggtca cgcgctcgg Beginn CYP2D6:
```

```
1 tgtgctgaga gtgtcctgcc tggctcctctg tgccctgggtg ggtgggggtg  
ccaggtgtgt
```

# Anhang

61 ccagaggagc ccatttggtg gtgaggcagg tatgggggcta gaagcactgg  
tgccctggc  
121 cgtgatagtg gccatcttcc tgctcctggg ggacctgatg caccggcgcc  
aacgctgggc  
Ex.1 181 tgcacgtac ccaccaggcc cctgcccact gcccgggctg ggcaacctgc  
tgcattgtga  
241 cttccagaac acaccatact gcttcgacca ggtgagggag gaggtcctgg  
agggcggcag  
301 aggtcctgag gatgccccac caccagcaa catgggtggg gggtgaaacc  
acaggctgga  
361 ccagaagcca ggctgagaag ggaagcagg tttgggggac ttctggaga  
agggcattta  
**1FA, 1R** 421 tacatggcat gaaggactgg attttccaaa ggccaaggaa gagtagggca  
agggcctgga  
481 ggtggagctg gacttggcag tgggcatgca agcccattgg gcaacatatg  
ttatggagta  
541 caaagtcctt tctgctgaca ccagaaggaa aggccttggg aatggaagat  
gagttagtcc  
601 tgagtgccgt ttaaatcacg aaatcgagga tgaagggggg gcagtgacct  
ggttcaaacc  
661 ttttgactg tgggtcctcg ggctcactg ctcaccggca tggaccatca  
tctgggaatg  
721 ggatgctaac tggggcctct cggcaatttt ggtgactctt gcaaggatcat  
acctgggtga  
781 cgcattccaa ctgagttcct ccattcacaga aggtgtgacc cccacccccg  
cccaggatc  
**2F** 841 aggaggctgg gtctcctcct tccacctgct cactcctggg agcccgggg  
gtcgtccaag  
901 gttcaaatag gactaggacc tgtagtctgg ggggatcctg gcttgacaag  
aggccctgac  
961 cctccctctg cagttgcggc gccgcttcgg ggacgtgttc agcctgcagc  
tggcctggac  
Ex.2 1021 gccggtgggc gtgctcaatg ggctggcgcc cgtgcgcgag gcgctgggtga  
cccacggcga  
1081 ggacaccgcc gaccgcccgc ctgtgcccat caccagatc ctgggtttcg  
ggccgcgttc  
1141 ccaaggcaag cagcgggtggg gacagagaca gatttccgtg ggacccgggt  
gggtgatgac  
**2FA** 1201 cgtagtccga gctgggcaga gagggcgcgg ggtcgtggac atgaaacagg  
ccagcgagtg  
**2R** 1261 gggacagcgg gccaaagaac cacctgcact agggaggtgt gagcatgggg  
acgaggcg

# Anhang

1321 ggcttgtgac gagtgggagg ggccactgcc gagacctggc aggagcccaa  
tgggtgaggc

1381 tggcgcatth cccagctgga atccggtgtc gaagtggggg gcggggaccg  
cacctgtgct

1441 gtaagctcag tgtgggtggc ggggggcccg cggggtcttc cctgagtga  
aaggcgggtca

1501 ggggtgggcag agacgaggtg gggcaaagcc ctgccccagc caagggagca  
aggtggatgc

**3F** 1561 acaaagagt ggcctgtga ccagctggac agagccaggg actgcgggag  
accagggga

1621 gcataggggt ggagtgggtg gtggatgggt gggctaagtc cttcatggcc  
acgcgcacgt

1681 gcccgtccca cccccagggg tgttctggc gcgctatggg cccgcgtggc  
gcgagcagag

Ex. 3 1741 gcgcttctcc gtctccacct tgcgcaactt gggcctgggc aagaagtcgc  
tggagcagtg

1801 ggtgaccgag gaggccgcct gcctttgtgc cgccttcgcc aaccactccg  
gtgggtgatg

1861 ggcagaaggg cacaagcgg gaactgggaa ggcgggggac ggggaaggcg  
acccttacc

1921 cgcattctcc accccagga cgcctcttc gcccaacgg tctcttggac  
aaagccgtga

**3FA** 1981 gcaacgtgat cgcctccctc acctgcgggc gccgcttcga gtacgacgac  
cctcgcttcc

Ex. 4 2041 tcaggctgct ggacctagct caggagggac tgaaggagga gtcgggcttt  
ctgcgcgagg

2101 tgcggagcga gagaccgagg agtctctgca gggcgagctc ccgagagggtg  
ccggggctgg

2161 actggggcct cggaagagca ggatttgcac agatgggttt gggaaaggac  
attccaggag

**3R** 2221 accccaactgt aagaagggcc tggaggagga ggggacatct cagacatggt  
cgtgggagag

2281 gtgtgcccg gtcagggggc accaggagag gccaaggact ctgtacctcc  
tatccacgtc

2341 agagatttcg attttagggt tctcctctgg gcaaggagag aggggtggagg  
ctggcacttg

**4F** 2401 gggagggact tggtaggtc agtggttaagg acaggcaggc cctgggtcta  
cctggagatg

2461 gctggggcct gagacttgtc caggtgaacg cagagcacag gagggattga  
gacccggttc

2521 tgtctgggtg aggtgctgaa tgctgtcccc gtctcctctgc atatcccagc  
gctggctggc

# Anhang

2581 aaggctctac gcttccaaaa ggctttcctg acccagctgg atgagctgct  
aactgagcac  
*Ex. 5* 2641 aggatgacct gggacccagc ccagccccc cgagacctga ctgaggcctt  
cctggcagag  
2701 atggagaagg tgagagtggc tgccacgggtg gggggcaagg gtggtgggtt  
gagcgtccca  
2761 ggaggaatga ggggaggctg ggcaaaaggt tggaccagtg catcaccg  
cgagccgcat  
**4FA** 2821 ctgggctgac aggtgcagaa ttggagggtca ttggggggt accccgttct  
gtcccagta  
2881 tgctctcggc cctgctcagg ccaaggggaa ccctgagagc agcttcaatg  
atgagaacct  
*Ex. 6* 2941 gtgcatagtg gtggctgacc tgttctctgc cgggatgggtg accacctga  
ccacgtggc  
3001 ctggggcctc ctgctcatga tctacatcc ggatgtgcag cgtgagcca  
tctgggaaac  
3061 agtgcagggg ccgaggagg aagggtacag gcggggggccc atgaactttg  
ctgggacacc  
3121 cggggctcca agcacaggct tgaccaggat cctgtaagcc tgacctctc  
caacatagga  
3181 ggcaagaagg agtgtcaggg ccggaccccc tgggtgctga cccattgtgg  
ggacgcatgt  
**4FB** 3241 ctgtccaggc cgtgtccaac aggagatcga cgacgtgata gggcagggtg  
ggcgaccaga  
3301 gatgggtgac caggctcaca tgccctacac cactgccgtg attcatgagg  
tgcagcgctt  
*Ex. 7* 3361 tggggacatc gtccccctgg gtgtgacca tatgacatcc cgtgacatcg  
aagtacagg  
3421 cttccgcac cctaaggtag gcctggcgcc ctctcacc cagctcagca  
ccagccctg  
3481 gtgatagccc cagcatggct actgccagggt gggccactc taggaaccct  
ggccacctag  
**4R** 3541 tctcaatgc caccacactg actgtccca cttgggtggg gggccagag  
tataggcagg  
**5F** 3601 gctggcctgt ccatccagag ccctcgtcta gtggggagac aaaccaggac  
ctgccagaat  
3661 gttggaggac ccaacacctg cagggagagg gggcagtgtg ggtgcctctg  
agaggtgtga  
3721 ctgcgcctg ctgtgggggtc ggagagggta ctgtggagct tctcgggcgc  
aggactagtt  
3781 gacagagtcc agctgtgtgc caggcagtgt gtgtccccg tgtgtttggt  
ggcaggggtc

## Anhang

```
3841 ccagcatcct agagtccagt cccactctc accctgcac ttctgccag
ggaacgacac
3901 tcatcaccaa cctgtcatcg gtgctgaagg atgaggccgt ctgggagaag
cccttcgct
Ex.8 3961 tccacccga acattcctg gatgccagg gccactttgt gaagccggag
gccttcctgc
4021 ctttctcagc aggtgcctgt ggggagccg gctccctgtc cccttcctg
gagttctgca
5FA 4081 ggggtatcac ccaggagcca ggctcactga cgccccctcc ctccccacag
gccgcctgc
4141 atgcctcggg gagccccctgg ccgcgatgga gctcttctc ttcttcacct
cctgctgca
Ex.9 4201 gcatttcagc ttctcgggtgc ccaactggaca gccccggccc agccaccatg
gtgtctttgc
4261 tttctggtg acccatccc cctatgagct ttgtgctgtg ccccgctaga
atggggtacc
4321 tagtccccag cctgctccct agccagaggc tctaattgtac aataaagcaa
tgtggtagtt
4381 cca

Ctcgggtccc ctgctcagc cctcgttggg atcactctcc tcagggaac cccacccctg +60
cctcattcct gcttacccca ccgcctggc gcatttgaga caggggtacg ttgaggctga +120
5R g P200 bis einschließlich
Anfang Primer 5R
```

Abb. 2.3: Basenabfolge der Übergangsregion zwischen CYP2D7 und CYP2D6, Basenabfolge des kompletten CYP2D6-Gens und der nachfolgenden Übergangsregion. Einzeichnung der Exons, Darstellung der verwendeten Primer der Vor-PCR mit den Primern P100/P200 nach Sachse et al. 1997, desweiteren Kennzeichnung der Lage aller designeten Sequenzierungsprimer forwards und rückwärts. Angabe der Primerpositionen nach der Genbank-Nomenklatur M33388.

# Anhang

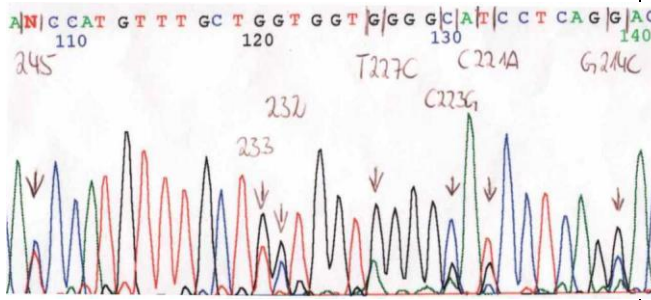
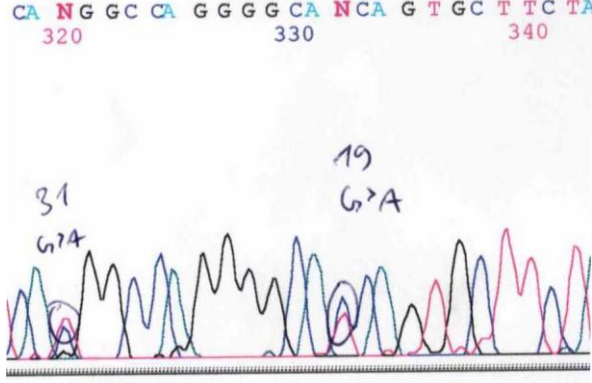

## Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Verwendung	Position
<b>CYP-17F</b>	5'TCCCCCACTGACCCAACTCT	PCR Duplikation	+155- +174
<b>CYP-32R</b>	5'CACGTGCAGGGGCACCTAGAT	PCR Duplikation	+5470- +5498
<b>CYP-207F</b>	5'CCCTCAGCCTCGTCACCTCAC	PCR Duplikation- Bestätigung	
<b>CYP Del F</b>	5'ACCGGGCACCTGTACTCTCTCA	PCR Deletion	+1619- +1639
<b>CYP Del R</b>	5'GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC	PCR Deletion	+3444- +3465
<b>P 81</b>	5'CGTCTAGTGGGGAGAACAAAC	PCR Deletion	+3621- +3640
<b>4647F</b>	5'AGGGAGCAGAGCAGTCACTG	PCR Deletion/PCR- Kontrolle	
<b>RYR1- 48R</b>	5' CACCTGCAGAGCGACATGAG	PCR Deletion/PCR- Kontrolle	
<b>P100f</b>	5'GGCCTA CCCTGG GTA AGGG CCTGGAGCAGGA	Vor-PCR	-180- 150
<b>P200r</b>	CTC AGC CTC AAC GTA CCC CTG TCT CAA ATG CG	Vor-PCR	+92- +123
<b>P450 1F</b>	5'GCCATCATCAGCTCCCTTTATA AG	Sequenzierung	
<b>P450 1F- A</b>	5'GGGCATTTATACATGGCATG	Sequenzierung	
<b>P450 1R</b>	5'CCTACTCTTCCTTGGCCTTGG	Sequenzierung	
<b>P450 2F</b>	5'CACCTGCTCACTCCTGGTAGC	Sequenzierung	
<b>P450 2F- A</b>	5'CCAGCGAGTGGGGACAGCGG	Sequenzierung	
<b>P450 2R</b>	5'TAGTGCAGGTGGTTTCTTGGC		
<b>P450 3F</b>	5'AGCAAGGTGGATGCACAAAGAG	Sequenzierung	
<b>P450 3F- A</b>	5'GCCTCCCTCACCTGCGGGCG	Sequenzierung	
<b>P450 3R</b>	5'CTCCTCCAGGCCCTTCTTACAG		
<b>P450 4F</b>	5'CCTGGGTCTACCTGGAGATGG	Sequenzierung	
<b>P450 4F- A</b>	5'TGCAGAATTGGAGGTCATTGG	Sequenzierung	
<b>P450 4F- B</b>	5'GTGTCCAACAGGAGATCGAC	Sequenzierung	
<b>P450 4R</b>	5'GTCAGTGTGGTGGCATTGAGG	Sequenzierung	
<b>P450 5F</b>	5'CCGTCTAGTGGGGAGACAAAC C	Sequenzierung	
<b>P450 5F- A</b>	5'AGTCTTGCAGGGGTATCACC	Sequenzierung	
<b>P450 5R</b>	5'CTCAGCCTCAACGTACCCCTG	Sequenzierung	

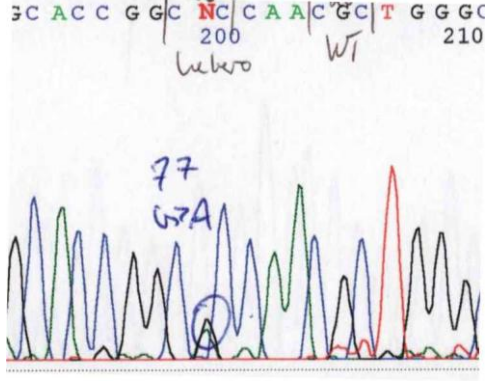
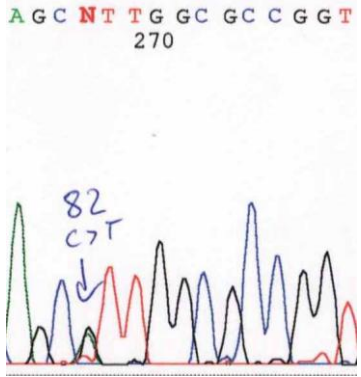
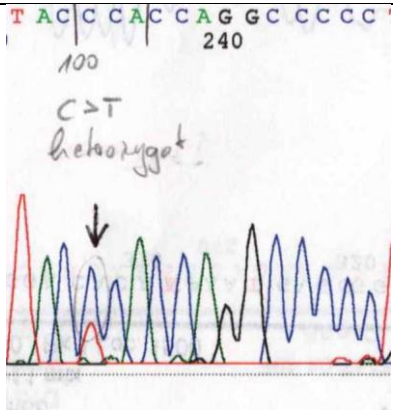
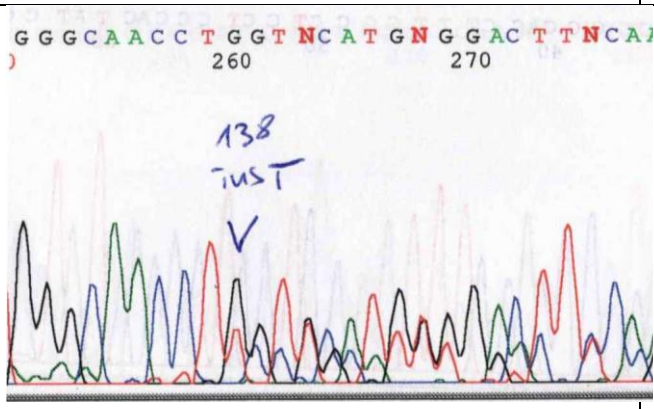
Tab. 2.8: Aufführung der verwendeten Primer mit Angabe der Verwendung und Position (nach AllenNomenklatur NCBI-Datenbank M33388).




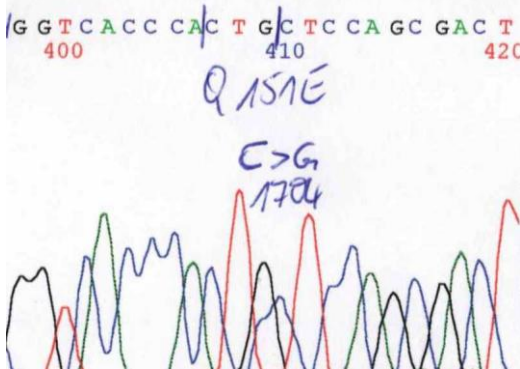
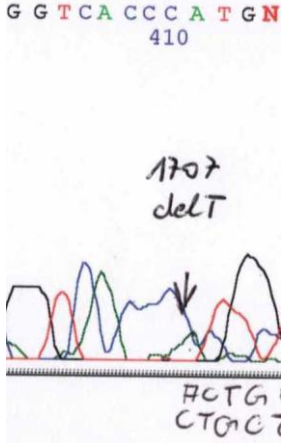
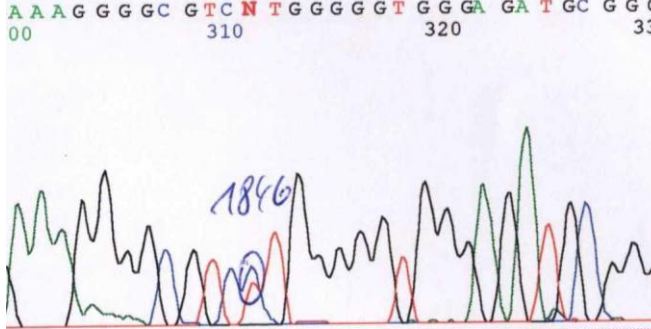
## Anhang

<u>Ausgewählte Sequenzkurvenausschnitte der nachgewiesenen SNP's</u>	<u>Polymorphismus (Stellenangaben nach Kimura et al., 1989, M33388)</u>	<u>Bemerkungen</u>
	7 conversion Intron 1	Primer 1R (Ablesung komplementär)
	19 G>A und 31 G>A	Primer 1R (Ablesung komplementär)
	31 G>A	Primer 1R (Ablesung komplementär)

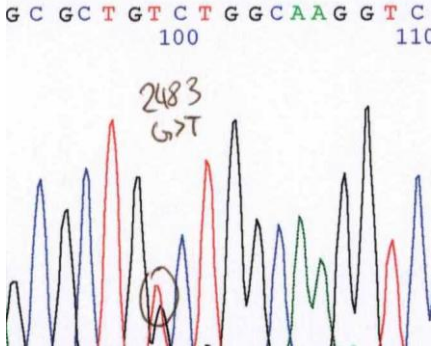
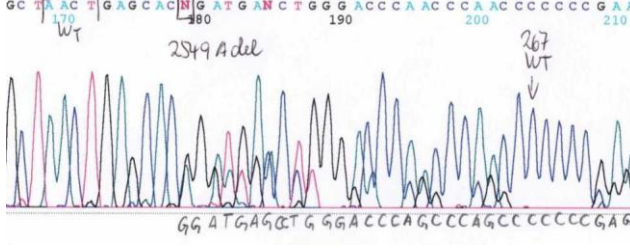
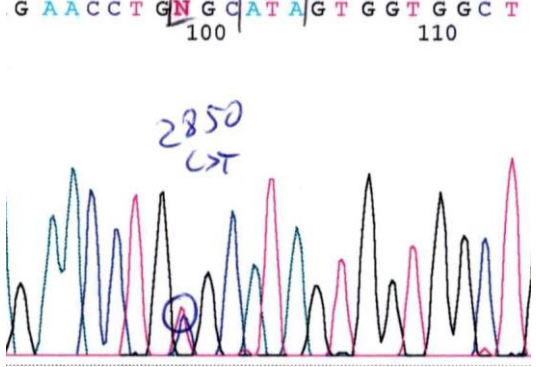
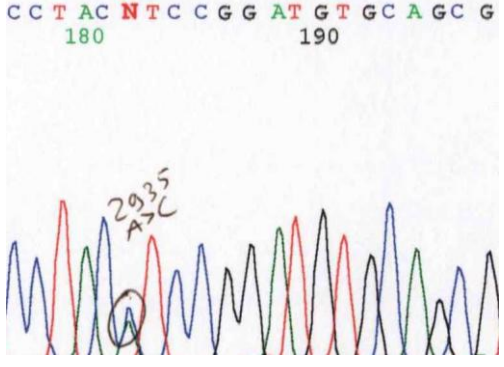
## Anhang

	77 G>A	Primer 1F
	82 C>T	Primer 1R (komplementär abzulesen)
	100 C>T	Primer 1F
	138 ins. T	Primer 1F

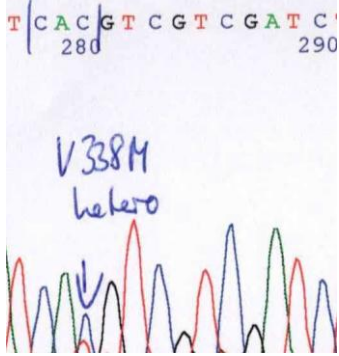
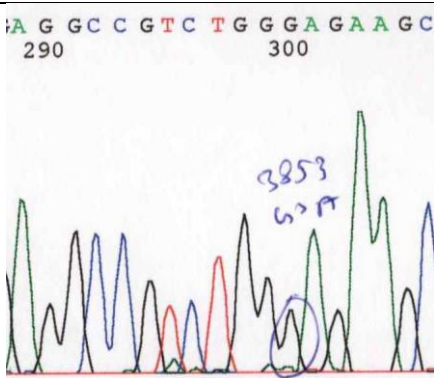
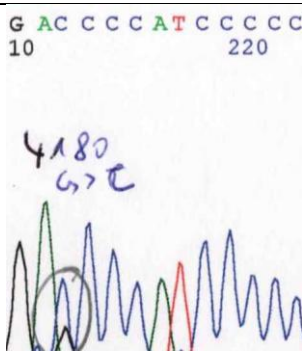
## Anhang

	<p>1023 C&gt;T (entspricht dem Aminosäureaustausch h Thr zu Ile am Triplet 107)</p>	<p>Primer 2F</p>
	<p>1704 C&gt;G</p>	<p>Primer 3R (Ablesung komplementär)</p>
	<p>1707 del T</p>	<p>Primer 3R (Ablesung komplementär)</p>
	<p>1846 G&gt;A</p>	<p>Primer 3R (komplementär abzulesen)</p>

# Anhang

	2483 G>T	Primer 4F
	2549 del A (resultierende Frameshift)	Primer 4F
	2850 C>T	Primer 4A
	2935 A>C	Primer 4A

## Anhang

	<p>3183 G&gt;A (Aminosäureaustausch h V gegen M am Triplett 338)</p>	<p>Primer 4R (Ablesung komplementär)</p>
	<p>3853 G&gt;A</p>	<p>Primer 5F</p>
	<p>4180 G&gt;C</p>	<p>Primer 5A</p>

### ***Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit***

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das indirekt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 17.11.2011

Konstanze Mühlmann-Gerlach

# Danksagung

---

## *Danksagung*

Ich danke im Besonderen meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. habil. Henrik Rüffert für die Überlassung des Themas und die intensive formelle Betreuung dieser Dissertation. Die konstruktive Kritik, die zügigen Korrekturen und seine jederzeit mögliche Ansprechbarkeit werden mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Frau Kerstin Krist gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Anleitung und Durchführung der Untersuchungen und die Ermutigungen, mit denen sie den Fortgang meiner Arbeit begleitet hat.

Dank spreche ich auch meiner Familie aus, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit parallel zum Berufseinstieg durch ihre vielfältige Unterstützung ermöglichte.





Leipzig, den 17.11.2011

Konstanze Mühlmann-Gerlach